

HANDBUCH  
DER  
LEBENSMITTEL-  
CHEMIE

I. BAND  
ALLGEMEINE  
UNTERSÜCHUNGSMETHODEN  
ZWEITER TEIL  
CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE METHODEN

HANDBUCH  
DER  
LEBENSMITTEL-  
CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON

A. BÖMER  
MÜNSTER I. W.

A. JUCKENACK  
BERLIN

J. TILLMANS†  
FRANKFURT A. M.

ZWEITER BAND  
ALLGEMEINE  
UNTERSUCHUNGSMETHODEN  
ZWEITER TEIL  
CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE METHODEN



SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH

# ALLGEMEINE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

## ZWEITER TEIL CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE METHODEN

BEARBEITET VON

A. K. BALLS · A. BÖMER · R. GRAU · C. GRIEBEL  
A. GRONOVER · J. GROSSFELD · A. SCHEUNERT  
M. SCHIEBLICH · K. TÄUFEL · A. TIMPE  
E. WALDSCHMIDT-LEITZ · O. WINDHAUSEN

SCHRIFTFLEITUNG:  
A. BÖMER

MIT 331 ABBILDUNGEN



SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH

ISBN 978-3-662-01948-1    ISBN 978-3-662-02244-3 (eBook)  
DOI 10.1007/978-3-662-02244-3

**ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG  
IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN.  
COPYRIGHT 1935 BY SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG  
URSPRÜNGLICH ERSCHIENEN BEI JULIUS SPRINGER IN BERLIN 1935  
SOFTCOVER REPRINT OF THE HARDCOVER 1ST EDITION 1935**

# Inhaltsverzeichnis.

| <b>Chemische Methoden.</b>  |  | Seite |
|---|--|-------|
| <b>Wasser.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER und Dr. R. GRAU-Münster i. W.   |  |       |
| (Mit 29 Abbildungen) . . . . .  |  | 537   |
| I. Nachweis des Wassers . . . . .   |  | 538   |
| II. Bestimmung des Wassers . . . . .  |  | 539   |
| A. Wasserbestimmung aus dem Trockenverlust . . . . .  |  | 539   |
| 1. Trockentemperaturen S. 539. — 2. Trockenapparate S. 540; a) Trockenschränke S. 540. — b) Exsiccatoren S. 546. — 3. Trocknungsverfahren S. 549.   |  |       |
| B. Wasserbestimmung durch Absorption . . . . .  |  | 553   |
| C. Wasserbestimmung durch Destillation . . . . .  |  | 553   |
| 1. Siedeflüssigkeiten S. 553. — 2. Allgemeines zur Methodik S. 554. — 3. Ausführung der Bestimmung S. 555.  |  |       |
| D. Wasserbestimmung durch chemische Umsetzungen . . . . .   |  | 557   |
| 1. Calciumcarbide-Methode S. 557. — 2. Calciumhydrid-Methode S. 560. — 3. Sonstige Methoden S. 561.   |  |       |
| E. Sonstige Verfahren . . . . .   |  | 562   |
| Dielektrizitätskonstanten S. 562. — Elektrischer Widerstand S. 564. — Leitfähigkeit S. 564. — Weitere Methoden S. 564.  |  |       |
| <b>Elementaranalyse.</b> Von Professor Dr. K. TÄUFEL-München. (Mit 25 Abbildungen)  |  |       |
| I. Qualitative organische Elementaranalyse. . . . .   |  | 565   |
| 1. Kohlenstoff S. 565. — 2. Wasserstoff S. 566. — 3. Sauerstoff S. 566. — 4. Stickstoff S. 566. — 5. Schwefel S. 567. — 6. Halogene S. 567. — 7. Sonstige Elemente S. 568.                                    |  |       |
| II. Quantitative organische Elementaranalyse . . . . .  |  | 568   |
| 1. Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff nach LIEBIG . . . . .   |  | 568   |
| a) Verbrennung bei nur Kohlen-, Wasser- und Sauerstoff S. 571. — b) Neben Stickstoff S. 574. — c) Neben Halogenen oder Schwefel S. 575. — d) Neben Alkalien und Erdalkalien S. 575.                           |  |       |
| 2. Bestimmung des Stickstoffs . . . . .   |  | 575   |
| a) Nach KJELDAHL S. 575. — b) Nach DUMAS S. 580. — c) Nach WILL-VARRENTRAPP S. 581. — d) Nach TER MEULEN und HESLINGA S. 581.   |  |       |
| 3. Bestimmung der Halogene . . . . .  |  | 582   |
| a) Nach CARIUS S. 582. — b) Nach LIEBIG S. 583. — c) Nach PRINGSHELM S. 584. — d) Nach TER MEULEN und HESLINGA S. 584.  |  |       |
| 4. Bestimmung des Schwefels . . . . .   |  | 585   |
| a) Nach CARIUS auf nassem Wege S. 585. — b) auf trockenem Wege S. 585. — c) Im Sauerstoffstrom S. 585. — d) Durch Hydrierung S. 586.  |  |       |
| 5. Bestimmung des Phosphors . . . . .   |  | 587   |
| 6. Elementaranalyse nach DENNSTEDT . . . . .  |  | 588   |
| a) Verbrennung bei Kohlen-, Wasser- und Sauerstoff S. 590. — b) Neben Stickstoff, Schwefel oder Halogenen S. 591. — c) Bestimmung von Schwefel oder Halogenen S. 591. — d) Bestimmung des Stickstoffs S. 592. |  |       |
| 7. Sonstige Verfahren . . . . .   |  | 593   |
| a) Bestimmung von Kohlenstoff auf nassem Wege S. 593. — b) Bestimmung von Sauerstoff durch Hydrierung S. 593. — c) Bestimmung von Arsen durch Hydrierung S. 595.  |  |       |
| III. Mikro-Elementaranalyse . . . . .   |  | 595   |
| a) Bestimmung von Kohlen- und Wasserstoff S. 596. — b) Bestimmung von Stickstoff nach DUMAS S. 598. — c) Desgleichen nach KJELDAHL S. 599. — d) Bestimmung der Halogene, des Schwefels und Phosphors S. 599.  |  |       |

|  | Seite |
|--|-------|
| <b>Stickstoffverbindungen.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER-Münster i. W.  |       |
| (Mit 10 Abbildungen) . . . . .   | 602   |
| <b>I. Proteine</b> . . . . .   | 602   |
| <b>A. Nachweis der Proteine</b> . . . . .  | 602   |
| 1. Fällungsreaktionen. . . . .   | 603   |
| a) Erhitzung S. 603. — b) Aussalzung S. 603. — c) Alkohol und Aceton S. 604. — d) Mineralsäuren S. 604. — e) Metallsalze S. 604. — f) Organische Säuren 604.   |       |
| 2. Farbenreaktionen . . . . .  | 604   |
| a) Biuretreaktion S. 605. — b) MILLONsche Reaktion S. 605. — c) ADAM-KIEWICZsche Reaktion S. 605. — d) Xanthoproteinreaktion S. 605. — e) Reaktionen mit aromatischen Aldehyden S. 605. — f) LIEBERMANNsche Reaktion S. 605. — g) ARNOLDSche Reaktion S. 606. — h) Diazo-, Schwefelblei- und Triketohydrindenhydratreaktion S. 606. — i) Sonstige Reaktionen S. 606. |       |
| <b>B. Bestimmung der Proteine</b> . . . . .  | 606   |
| 1. Bestimmung des Rohproteins . . . . .  | 606   |
| 2. Bestimmung des Reinproteins . . . . .   | 607   |
| a) Kupferhydroxydverfahren S. 607. — b) Uranacetatverfahren S. 608. c) Alkoholverfahren S. 609. — d) Ultrafiltration S. 609. — e) Sonstige Verfahren S. 610.   |       |
| 3. Bestimmung des verdaulichen Proteins . . . . .  | 610   |
| 4. Bestimmung von Proteosen und Peptonen . . . . .   | 611   |
| a) Proteosen S. 612. — b) Peptone S. 612.  |       |
| <b>C. Hydrolyse der Proteine</b> . . . . .   | 613   |
| a) Nach E. FISCHER S. 614. — b) Nach KOSSEL und SCHULZE S. 614. — c) Nach VAN SLYKE S. 614.  |       |
| <b>II. Aminosäuren</b> . . . . .   | 615   |
| <b>A. Allgemeine Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung</b> . . . . .  | 615   |
| 1. Nachweis von Aminosäuren . . . . .  | 615   |
| a) Kupferverbindungen S. 615. — b) Quecksilberverbindungen S. 615. — c) Benzoyl-, Benzolsulfo-, $\alpha$ -Naphthalinsulfochlorid-, Phenyl-, $\alpha$ -Naphthylisocyanatverbindungen S. 615. — d) Alkylester S. 615. — e) Farbreaktionen S. 615.  |       |
| 2. Bestimmung von Aminosäuren . . . . .  | 617   |
| a) Formolverfahren nach SOERENSEN S. 617. — b) Desgleichen nach ASCHMARIN S. 619. — c) Nitritverfahren S. 619. — d) Acidimetrisches Verfahren S. 622. — e) Stufentitration S. 623. — f) Carbinosäureverfahren S. 624. — g) Ninhydrinverfahren S. 624.  |       |
| <b>B. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Aminosäuren</b> . . . . .  | 625   |
| 1. Monoamino-monocarbonsäuren . . . . .  | 626   |
| a) Glykokoll S. 626. — b) d-Alanin S. 626. — c) d-Valin S. 626. — d) l-Leucin S. 626. — e) d-Isoleucin S. 627. — f) l-Phenylalanin 627. — g) l-Tyrosin S. 627. — h) l-Serin S. 628. — i) Cystein S. 628. — k) l-Cystin S. 628.   |       |
| 2. Monoamino-dicarbonsäuren und ihre Säureamide . . . . .  | 629   |
| a) Asparaginsäure S. 629. — b) Glutaminsäure S. 629. — Säureamide S. 630.  |       |
| 3. Diamino-monocarbonsäuren . . . . .  | 630   |
| a) Arginin S. 630. — b) Lysin S. 632. — c) Ornithin S. 632.  |       |
| 4. Heterocyclische Aminosäuren . . . . .   | 632   |
| a) Histidin S. 632. — b) Prolin und Oxyprolin S. 633. — c) Tryptophan S. 633.  |       |
| <b>III. Amine</b> . . . . .  | 636   |
| <b>A. Nachweis von Methyl- oder Äthylaminen.</b> . . . . .   | 638   |
| 1. Nachweis der einzelnen Amine . . . . .  | 638   |
| a) Primäre S. 638. — b) Sekundäre S. 638. — c) Tertiäre S. 638.  |       |
| 2. Nachweis der Amine nebeneinander . . . . .  | 639   |
| 3. Nachweis von Aminen neben Ammoniak . . . . .  | 640   |
| 4. Nachweis von Alkylaminen nebeneinander und neben Ammoniak . . . . .   | 640   |
| <b>B. Bestimmung von Methyl- und Äthylaminen</b> . . . . .   | 640   |
| 1. Bestimmung von Trimethylamin . . . . .  | 640   |
| 2. Bestimmung von Aminen neben Ammoniak . . . . .  | 641   |

|   | Seite      |
|---|------------|
| IV. Ammoniak . . . . .  | 642        |
| A. Nachweis von Ammoniak . . . . .  | 642        |
| B. Bestimmung des Ammoniaks . . . . .   | 643        |
| 1. Destillationsverfahren S. 643. — a) Ausführung der Destillation S. 643. — b) Bestimmung des Ammoniaks im Destillat S. 645. — 2. Ausblaseverfahren nach FOLIN S. 646. — 3. Hypobromitverfahren S. 647. — 4. Colorimetrisches Verfahren S. 649. — 5. Sonstige Verfahren S. 649.  |            |
| V. Salpetersäure . . . . .  | 650        |
| A. Nachweis der Salpetersäure . . . . .   | 650        |
| 1. Diphenylaminreaktion S. 650. — 2. Brucinreaktion S. 651. — 3. Nitronreaktion S. 651. — 4. Sonstige Reaktionen S. 651.  |            |
| B. Bestimmung der Salpetersäure . . . . .   | 652        |
| 1. Überführung in Stickoxyd S. 652. — 2. Überführung in Ammoniak S. 655. — 3. Nitronverfahren S. 658. — 4. Colorimetrisches Verfahren S. 659. — 5. Sonstige Verfahren S. 660.   |            |
| VI. Salpetrige Säure . . . . .  | 660        |
| A. Nachweis der Salpetrigen Säure . . . . .   | 660        |
| 1. Aminosulfonsäurereaktion S. 660. — 2. Kaliumjodidreaktion S. 661. — 3. Naphthylamin-Sulfanilsäurereaktion S. 661. — 4. Diphenylaminreaktion S. 662. — 5. Metaphenylendiaminreaktion S. 662. — 6. Resorcinreaktion S. 662. — 7. Indolreaktion S. 662. — 8. Sonstige Reaktionen S. 663.  |            |
| B. Bestimmung der Salpetrigen Säure . . . . .   | 663        |
| 1. Titration mit Kaliumpermanganat S. 663. — 2. Jodometrisches Verfahren S. 664. — 3. Bromometrisches Verfahren S. 665. — 4. GROSSMANN'S Verfahren S. 665. — 5. Aminosulfosäureverfahren S. 665. — 6. Gasometrisches Verfahren S. 666. — 7. Methylesterverfahren S. 667. — 8. Colorimetrisches Verfahren S. 668. — 9. Nachweis und Bestimmung von Nitriten neben Sulfiten S. 668. |            |
| <b>Serologische Methoden zur Unterscheidung von Proteinen. Von Professor Dr. C. GRIEBEL-Berlin. (Mit 7 Abbildungen) . . . . .</b>   | <b>670</b> |
| I. Antikörper und ihre Eigenschaften . . . . .  | 670        |
| II. Präcipitine . . . . .   | 675        |
| 1. Präcipitin erzeugende Stoffe (Präcipitinogene) S. 675. — 2. Präcipitinbildung im Körper S. 677. — 3. Eigenschaften und Spezifität der Präcipitine S. 677. — 4. Entstehung der Präcipitate S. 680.  |            |
| III. Nachweis und Differenzierung von spezifischen Proteinen mit Hilfe präcipitierender Antisera . . . . .  | 680        |
| A. Nachweis und Differenzierung von Blut- und Fleischarten . . . . .  | 681        |
| 1. Herstellung präcipitierender Antisera . . . . .  | 681        |
| 2. Eigenschaften und Aufbewahrung der Antisera . . . . .  | 683        |
| 3. Ausführung der Präcipitinreaktion (biologischen Reaktion) . . . . .  | 685        |
| a) Blutuntersuchung S. 685. — b) Fleisch- und Wurstuntersuchung S. 688. — c) Untersuchung von Fettgewebe, Fetten, Knochen und Därmen S. 692. — d) Fischfleischuntersuchung S. 692.  |            |
| B. Unterscheidung von Milcharten, Milchprodukten und Caseinpräparaten . . . . .   | 692        |
| C. Unterscheidung von Eiklar und Eigelb . . . . .   | 695        |
| D. Unterscheidung von Kaviar, Honig und Nahrungsmitteln . . . . .   | 696        |
| E. Nachweis und Unterscheidung pflanzlicher Proteine . . . . .  | 698        |
| F. Quantitative Bestimmungen mittels der Präcipitinreaktion . . . . .   | 700        |
| IV. Methode der Komplement-Ablenkung oder -Bindung . . . . .  | 700        |
| V. Anaphylaxieversuch . . . . .   | 702        |
| VI. Verfahren der Amboceptorbindung durch kochbeständige Receptoren . . . . .   | 703        |
| <b>Enzyme. Von Professor Dr. E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. K. BALLS-Prag. (Mit 24 Abbildungen) . . . . .</b>  | <b>704</b> |
| I. Allgemeine Methodik der Enzymbestimmung und Enzymvermehrung . . . . .  | 705        |
| A. Grundlagen der Enzymbestimmung . . . . .   | 705        |
| B. Reinigungsmethoden von Enzymen . . . . .   | 710        |
| 1. Dialyse, Elektrodialyse und Adsorption S. 710. — 2. Darstellung von Adsorptionsmitteln S. 712.   |            |

|  | Seite |
|--|-------|
| II. Hydrolytische Enzyme. . . . .  | 714   |
| A. Lipasen und Esterasen . . . . .   | 714   |
| 1. Bestimmungsmethoden der Lipasen . . . . .   | 715   |
| a) Titrimetrische Methode S. 715. — b) Stalagmometrische Methode S. 717. — c) Gasanalytische Methode S. 719.   |       |
| 2. Gewinnung und Reinigung der Lipasen . . . . .   | 720   |
| a) Tierische Lipasen S. 720. — b) Pflanzliche Lipasen S. 721.  |       |
| 3. Andere Esterasen . . . . .  | 723   |
| a) Phosphatase S. 723. — b) Sulfatase S. 724. — c) Tannase S. 724. — d) Chlorophyllase S. 725.   |       |
| B. Kohlenhydratspaltende Enzyme . . . . .  | 726   |
| 1. Bestimmungsmethode der kohlenhydratspaltenden Enzyme . . . . .  | 726   |
| a) Allgemeine Methodik S. 726. — b) Spezielle Vorschriften zur Bestimmung der Carbohydrasen S. 727, $\alpha$ ) Saccharase S. 727, $\beta$ ) Maltase S. 729, $\gamma$ ) Emulsin S. 730, $\delta$ ) Galaktosidase S. 731, $\epsilon$ ) Amylase S. 732.   |       |
| 2. Gewinnung und Reinigung der Hexosidasen . . . . .   | 734   |
| a) Fructosidase S. 734. — b) $\alpha$ -Glucosidasen S. 738, $\alpha$ ) Maltase S. 738, $\beta$ ) Gluco-Saccharase S. 739. — c) $\beta$ -Glucosidase S. 740. — d) Galaktosidasen S. 741.  |       |
| 3. Gewinnung und Reinigung der Polyasen. . . . .   | 741   |
| a) Amylasen S. 741. — b) Cellulase und Lichenase S. 744. — c) Pektin-spaltende Enzyme S. 745.  |       |
| C. Proteasen . . . . .   | 746   |
| 1. Bestimmungsmethoden von proteolytischen Enzymen . . . . .   | 747   |
| a) Allgemeine Methodik S. 747. — b) Spezielle Vorschriften zur Bestimmung S. 749, $\alpha$ ) ereptische Enzyme S. 749, $\beta$ ) tryptische Enzyme S. 752, $\gamma$ ) katheptische Enzyme S. 755, $\delta$ ) Pepsin S. 758.  |       |
| 2. Gewinnung und Isolierung der Proteasen des tierischen Verdauungs-traktes . . . . .  | 760   |
| a) Proteolytische Enzyme der Darmschleimhaut S. 761. — b) Desgleichen des Pankreas S. 764. — c) Desgleichen des Pepsins S. 766.  |       |
| 3. Gewinnung und Isolierung der Proteasen der tierischen Organe und Gewebe . . . . .   | 768   |
| a) Enzyme der Organe S. 768. — b) Desgleichen des Blutes S. 770. — c) Blutgerinnung S. 771.  |       |
| 4. Gewinnung und Isolierung pflanzlicher Proteasen . . . . .   | 773   |
| a) Proteolytische Enzyme der Hefe S. 773. — b) Papain und verwandte Proteasen S. 776. — c) Proteolytische Enzyme der Samen S. 777. d) Nucleasen S. 778.  |       |
| D. Amidasen . . . . .  | 781   |
| 1. Histozym S. 781. — 2. Urease S. 782 — 3. Arginase S. 785. — 4. Asparaginase S. 787. — 5. Purinamidasen S. 787.  |       |
| III. Enzyme des Energiestoffwechsels . . . . .   | 789   |
| A. Enzyme der Gärung . . . . .   | 789   |
| 1. Enzymsystem der Gärung S. 789. — 2. Messung der Gärung S. 790. — 3. Darstellung von Hefepreßsaft und Trockenhefe S. 791. — 4. Bestimmung und Isolierung der Co-Zymase S. 792. — 5. Aldehydmutase der Hefe S. 795. — 6. Wirkung von Magnesiumionen S. 796. — 7. Phosphorylierung S. 796. — 8. Carboxylase S. 798. — 9. Vergärungsformen nach NEUBERG S. 798. — 10. Carboligase S. 800. |       |
| B. Biologische Oxydation . . . . .   | 801   |
| 1. Glykolyse und Atmung . . . . .  | 801   |
| a) Bestimmung der Milchsäure S. 801. — b) Messung der Glykolyse und Atmung S. 804.   |       |
| 2. Dehydrodrasen . . . . .   | 810   |
| a) Messung der Wasserstoffaktivierung S. 810. — b) Bestimmung der Dehydrodrasewirkung S. 811. — c) Alkoholdehydrodrasen S. 812. — d) Aldehydrasen S. 812. — e) Purindehydrodrasen S. 814.  |       |
| 3. Urikolytisches Enzym . . . . .  | 815   |
| 4. Tyrosinase . . . . .  | 815   |
| 5. Katalase . . . . .  | 818   |
| a) Bestimmungsmethoden S. 818. — b) Darstellung von Katalasepräparaten S. 819. — c) Eigenschaften der Katalase S. 820.   |       |
| 6. Peroxydase . . . . .  | 820   |
| a) Bestimmung der Wirkung S. 820. — b) Darstellung von Präparaten S. 822. — c) Eigenschaften S. 824.   |       |



|   | Seite |
|---|-------|
| <b>Fett.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER-Münster . W. (Mit 5 Abbildungen) . . . . .    | 825   |
| I. Nachweis des Fettes . . . . .  | 825   |
| II. Bestimmung des Fettes . . . . .   | 826   |
| 1. Nach SOXHLET S. 826. — 2. Nach GROSSFELD S. 829. — 3. Sonstige Verfahren S. 832.   |       |
| <b>Kohlenhydrate.</b> Von Professor Dr. J. GROSSFELD-Berlin. (Mit 18 Abbildungen) . . | 835   |
| I. Bestimmung der wasserlöslichen Stoffe . . . . .                                    | 836   |
| 1. Extraktbestimmung durch Wägung des Extraktstückstandes S. 836. —                   |       |
| 2. Desgleichen aus der Dichte der Lösung S. 837. — 3. Sonstige Verfahren              |       |
| S. 843. — 4. Bestimmung der wasserlöslichen Kohlenhydrate S. 844. — 5. Be-            |       |
| stimmung von Begleitstoffen der Kohlenhydrate S. 845.                                 |       |
| II. Nachweis und Bestimmung der Zuckerarten . . . . .                                 | 845   |
| A. Allgemeine Reaktionen auf Zucker. . . . .  | 845   |
| B. Nachweis einzelner Zucker in Gemischen. . . . .                                    | 846   |
| 1. Nachweis der Hexosen. . . . .  | 846   |
| a) Darstellung der Hydrazone und Osazone S. 848. — b) Nachweis                        |       |
| durch sonstige Reaktionen S. 850.   |       |
| 2. Nachweis von Pentosen . . . . .  | 855   |
| a) Nachweis durch Farbenreaktionen S. 855. — b) Nachweis der ein-                     |       |
| zelnen Pentosen S. 857.   |       |
| 3. Nachweis von Di- und Trisacchariden . . . . .                                      | 858   |
| a) Saccharose S. 858. — b) Lactose S. 858. — c) Raffinose S. 858. —                   |       |
| d) Melezitose S. 859. — e) Trifruktan S. 860.   |       |
| C. Bestimmung der Hexosen. . . . .  | 860   |
| <i>Zuckerbestimmung durch Reduktionsmethoden.</i> . . . . .                           | 860   |
| 1. Gewichtsanalytisch mit FEHLINGScher Lösung . . . . .                               | 861   |
| a) Glucose S. 862. — b) Invertzucker S. 862. — c) Maltose S. 862. —                   |       |
| d) Lactose S. 863. — e) Pentosen S. 863.  |       |
| 2. Maßanalytisch mit FEHLINGScher Lösung . . . . .                                    | 863   |
| a) Direkte Titration des Zuckers S. 863. — b) Desgleichen des Kupfer-                 |       |
| oxyduls S. 863. — c) Indirekte Titration des Kupferüberschusses S. 866.               |       |
| 3. Maßanalytisch mit LUFFScher Lösung . . . . .                                       | 871   |
| 4. Sonstige Reduktionsmethoden . . . . .  | 873   |
| a) Kaliumferricyanidverfahren S. 873. — b) Colorimetrisches Pikrat-                   |       |
| verfahren S. 874. — c) Andere Verfahren S. 875.                                       |       |
| <i>Zuckerbestimmung durch Polarisation.</i> . . . . .                                 | 875   |
| 1. Spezifische Drehung der einzelnen Zuckerarten . . . . .                            | 876   |
| 2. Klärung und Entfärbung der Zuckerlösungen . . . . .                                | 879   |
| a) Mit Bleiessig S. 880. — b) Mit Tannin und Bleiessig S. 881. —                      |       |
| c) Mit Kaliumferrocyanid und Zinksulfat S. 881. — d) Sonstige Klär-                   |       |
| methoden S. 882.  |       |
| 3. Berücksichtigung des Volumens des Unlöslichen . . . . .                            | 882   |
| D. Bestimmung der Pentosen . . . . .  | 883   |
| E. Bestimmung der Disaccharide . . . . .  | 883   |
| 1. Bestimmung der Saccharose . . . . .  | 883   |
| a) Bei Abwesenheit sonstiger Kohlenhydrate S. 883. — b) Bei Gegen-                    |       |
| wart anderer Zucker S. 884.   |       |
| 2. Bestimmung der Maltose . . . . .   | 890   |
| 3. Bestimmung der Lactose . . . . .   | 890   |
| F. Bestimmung der Zucker nebeneinander. . . . .                                       | 890   |
| 1. Glucose und Fructose . . . . .   | 890   |
| a) Bestimmung der Glucose mit alkalischer Jodlösung S. 890. —                         |       |
| b) Bestimmung der Fructose nach Oxydation der Aldosen S. 892. —                       |       |
| c) Polarimetrische Bestimmung S. 893. — d) Colorimetrische Bestim-                    |       |
| mung der Fructose S. 895.   |       |
| 2. Glucose, Fructose, Saccharose, Dextrin und Fructosane . . . . .                    | 895   |
| a) Saccharose, Invertzucker und Stärkesirup S. 895. — b) Saccharose                   |       |
| und Fructosane S. 898.  |       |
| 3. Maltose, Glucose und Dextrin . . . . .   | 900   |
| 4. Maltose, Saccharose und Invertzucker . . . . .                                     | 901   |
| 5. Lactose neben anderen Zuckern. . . . .   | 902   |
| G. Nachweis und Bestimmung der Zucker durch Vergärung . . . . .                       | 904   |
| 1. Verhalten der Zucker gegen Hefen . . . . .   | 904   |
| 2. Vergärung nach HÖRMANN und KÖNIG . . . . .   | 904   |

|  | Seite |
|--|-------|
| III. Nachweis und Bestimmung der Hexosane und Pentosane . . . . .  | 908   |
| A. Nachweis und Bestimmung der Dextrine . . . . .  | 908   |
| 1. Nachweis der Dextrine . . . . .   | 908   |
| a) Alkohol-fällung S. 908. — b) Jodreaktion S. 909.  |       |
| 2. Bestimmung der Dextrine . . . . .   | 910   |
| a) Alkoholverfahren S. 910. — b) Gärverfahren S. 911. — c) Nach Zerstörung der Zucker S. 912. — d) Bestimmung von Stärkesirup S. 912.  |       |
| B. Nachweis und Bestimmung der Stärke . . . . .  | 912   |
| 1. Nachweis der Stärke . . . . .   | 913   |
| 2. Bestimmung der Stärke . . . . .   | 913   |
| a) Durch direkte Abscheidung S. 913. — b) Polarimetrische Bestimmung S. 919. — c) Durch Überführung in Zucker S. 923. — d) Sonstige Verfahren S. 927.  |       |
| C. Bestimmung der Pentosane . . . . .  | 928   |
| 1. Bestimmung der Gesamt-Pentosane . . . . .   | 928   |
| a) Nach TOLLENS S. 928. — b) Barbitursäureverfahren S. 930. — c) Nach KULLGREN und TYDEN S. 932.   |       |
| 2. Bestimmung der Methylpentosane . . . . .  | 934   |
| 3. Bestimmung der Proto- und Hemi-Hexosane und -Pentosane . . . . .  | 936   |
| IV. Bestimmung der Bestandteile der Zellmembran . . . . .  | 936   |
| A. Bestimmung der Rohfaser . . . . .   | 936   |
| 1. Nach HENNEBERG und STOHMANN S. 940. — 2. Nach KÖNIG S. 941. — 3. Nach KÜRSCHNER und HANAK S. 943.   |       |
| B. Bestimmung von Cellulose, Lignin und Cutin . . . . .  | 945   |
| 1. Nach J. KÖNIG S. 945. — 2. Direkte Ligninbestimmung S. 946. — 3. Direkte Cellulosebestimmung S. 947.  |       |
| V. Bestimmung sonstiger stickstofffreier Extraktstoffe . . . . .   | 947   |
| A. Bestimmung und Untersuchung der Pektinstoffe . . . . .  | 947   |
| 1. Begriff der Pektinstoffe S. 947. — 2. Nachweis und Bestimmung des Pektins S. 950.   |       |
| B. Untersuchung von Glucosiden, Gummiarten und Schleimstoffen . . . . .  | 959   |
| 1. Voruntersuchung S. 959. — 2. Hydrolyse S. 960.  |       |
| C. Nachweis und Bestimmung von Mannit, Sorbit, Dulcit und Inosit . . . . .   | 962   |
| 1. Mannit S. 963. — 2. Sorbit S. 965. — 3. Inosit S. 973.  |       |
| <b>Alkohole.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER und Dr. O. WINDHAUSEN-Münster i. W. (Mit 4 Abbildungen) . . . . .  | 977   |
| I. Allgemeines zum Nachweis und zur Bestimmung von Alkoholen . . . . .   | 977   |
| A. Nachweis von alkoholischen OH-Gruppen . . . . .   | 977   |
| 1. Esterbildung S. 977. — 2. Farbenreaktionen S. 981.  |       |
| B. Bestimmung von Alkoholen . . . . .  | 983   |
| 1. Veresterung mit Essigsäureanhydrid S. 983. — 2. Desgleichen mit Ameisensäure S. 984. — 3. Desgleichen mit Salpetriger Säure S. 985. — 4. Überführung in Alkyljodide S. 988. — 5. Oxydation der Alkohole S. 989. |       |
| II. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Alkohole . . . . .   | 990   |
| A. Methylalkohol . . . . .   | 990   |
| 1. Nachweis des Methylalkohols . . . . .   | 990   |
| a) Veresterungsverfahren S. 990. — b) Oxydationsverfahren S. 991.  |       |
| 2. Bestimmung des Methylalkohols . . . . .   | 993   |
| a) Bestimmung aus dem Spezifischen Gewicht S. 994. — b) Refraktometrische Bestimmung S. 994. — c) Verfahren von REIF S. 994. — d) Oxydationsverfahren S. 996.  |       |
| 3. Nachweis von Äthylalkohol und Methylalkohol . . . . .   | 998   |
| 4. Bestimmung von Methyl- und Äthylalkohol in Gemischen . . . . .  | 999   |
| a) Refraktometrisch-aräometrisches Verfahren S. 999. — b) Durch Elementaranalyse S. 1002. — c) Oxydationsverfahren S. 1002.  |       |
| B. Äthylalkohol . . . . .  | 1004  |
| a) Anforderungen an die Reinheit S. 1005. — b) Nachweis von vergälltem Alkohol S. 1006.  |       |
| 1. Nachweis des Äthylalkohols . . . . .  | 1007  |
| a) Jodoformverfahren S. 1007. — b) Esterreaktionen S. 1007. — c) Farbenreaktionen S. 1007.   |       |

|  | Seite |
|--|-------|
| 2. Bestimmung des Äthylalkohols . . . . .  | 1008  |
| a) Bestimmung aus dem Spezifischen Gewicht S. 1008. — b) Refrakto-                     |       |
| metrische Bestimmung S. 1011. — c) Bestimmung als Jodoform S. 1011. —                  |       |
| d) Oxydationsverfahren S. 1011. — e) Aussalzverfahren S. 1012. — f) Son-               |       |
| stige Verfahren S. 1013.   |       |
| C. Propylalkohole . . . . .  | 1014  |
| 1. Bestimmung des Propylalkohols . . . . .   | 1014  |
| 2. Nachweis des Isopropylalkohols . . . . .  | 1015  |
| a) Durch Oxydation S. 1015. — b) Mittels Piperonals S. 1017. —                         |       |
| c) Nach BODENDORF S. 1017. — d) Nach LEFFMANN und PINES S. 1018.                       |       |
| 3. Bestimmung des Isopropylalkohols . . . . .  | 1018  |
| a) Nach NOETZEL S. 1018. — b) Nach CASSAR S. 1019.                                     |       |
| D. Butylalkohole . . . . .   | 1019  |
| 1. Bestimmung des Butylalkohols S. 1019. — 2. Nachweis des Isobutyl-                   |       |
| alkohols S. 1020.  |       |
| E. Amylalkohole . . . . .  | 1020  |
| 1. Nachweis von Amylalkohol S. 1021. — 2. Bestimmung von Amyl-                         |       |
| alkohol S. 1022.   |       |
| <b>Aldehyde und Ketone.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER und Dr. O. WINDHAUSEN-          |       |
| Münster i. W. (Mit 1 Abbildung) . . . . .  | 1023  |
| I. Allgemeine Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung von                             |       |
| Aldehyden . . . . .  | 1023  |
| 1. Nachweis von Aldehyden . . . . .  | 1023  |
| a) Reduktionsverfahren S. 1024. — b) Fällungsreaktionen S. 1025. —                     |       |
| c) Farbenreaktionen S. 1030.   |       |
| 2. Bestimmung von Aldehyden . . . . .  | 1031  |
| a) Nach BOUGAULT und GROS S. 1031. — b) Nach RIPPER S. 1032. —                         |       |
| c) Phenylhydrazinverfahren S. 1032. — d) Nach FEINBERG S. 1033. —                      |       |
| e) Hydroxylaminverfahren S. 1033. — f) Nach PONNDORF S. 1034.                          |       |
| II. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Aldehyde . . . . .                           | 1035  |
| 1. Formaldehyd . . . . .   | 1035  |
| a) Nachweis von Formaldehyd . . . . .  | 1036  |
| $\alpha$ ) Überführung in Hexamethylentetramin S. 1037. — $\beta$ ) Farben-            |       |
| reaktionen S. 1037.  |       |
| b) Bestimmung des Formaldehyd . . . . .  | 1039  |
| $\alpha$ ) Ammoniumchloridverfahren S. 1039. — $\beta$ ) Wasserstoffsperoxyd-          |       |
| verfahren S. 1040. — $\gamma$ ) Natriumsulfitverfahren S. 1040. — $\delta$ ) Mercuri-  |       |
| metrisches Verfahren S. 1041. — $\epsilon$ ) Jodverfahren S. 1041. — $\zeta$ ) Methon- |       |
| verfahren S. 1042. — $\eta$ ) Kaliumcyanidverfahren S. 1042. — $\theta$ ) Colori-      |       |
| metrisches Verfahren S. 1043. — $\iota$ ) Sonstige Verfahren S. 1043.                  |       |
| Hexamethylentetramin . . . . .   | 1043  |
| 2. Acetaldehyd . . . . .   | 1044  |
| a) Nachweis von Acetaldehyd . . . . .  | 1045  |
| $\alpha$ ) Reaktion mit Quecksilberoxyd S. 1045. — $\beta$ ) Reaktion mit Nitro-       |       |
| prussidnatrium und Piperidin, Piperazin sowie sekundären Aminen S. 1046.               |       |
| $\gamma$ ) Reaktion mit Metaphenylendiamin S. 1046. — $\delta$ ) Reaktion mit          |       |
| Benzidinchlorhydrat S. 1046. — $\epsilon$ ) Mikrochemischer Nachweis S. 1047.          |       |
| b) Bestimmung des Acetaldehyds . . . . .   | 1047  |
| 3. Benzaldehyd . . . . .   | 1048  |
| a) Nachweis von Benzaldehyd S. 1048. — b) Bestimmung des Benz-                         |       |
| aldehyds S. 1049.  |       |
| 4. Vanillin und Piperonal . . . . .  | 1050  |
| a) Vanillin S. 1050. — b) Piperonal (Heliotropin) S. 1053.                             |       |
| 5. Sonstige Aldehyde . . . . .   | 1054  |
| a) Zimtaldehyd S. 1054. — b) Salicylaldehyd S. 1054. — c) Furan-                       |       |
| aldehyde S. 1055.  |       |
| III. Nachweis und Bestimmung von Ketonen . . . . .                                     | 1058  |
| 1. Aceton . . . . .  | 1058  |
| a) Nachweis von Aceton . . . . .   | 1059  |
| $\alpha$ ) Fällungsreaktionen S. 1059. — $\beta$ ) Farbenreaktionen S. 1060.           |       |
| b) Bestimmung des Acetons . . . . .  | 1062  |
| $\alpha$ ) Als Jodoform S. 1062. — $\beta$ ) Mercurimetrische Bestimmung S. 1063.      |       |
| $\gamma$ ) Sonstige Verfahren S. 1063.   |       |
| 2. Diacetyl . . . . .  | 1064  |
| a) Nachweis S. 1064. — b) Bestimmung S. 1065.  |       |

|   | Seite |
|---|-------|
| IV. Nachweis und Bestimmung von Aldehyden, Aceton und Äthylalkohol nebeneinander . . . . .  | 1066  |
| 1. Aldehyde und Ketone S. 1066. — 2. Formaldehyd und Hexamethylen-tetramin S. 1066. — 3. Form- und Acetaldehyd S. 1067. — 4. Formaldehyd und Aceton S. 1067. — 6. Acetaldehyd und Aceton S. 1068. — 7. Aceton, Form- und Acetaldehyd S. 1070. — 8. Äthylalkohol, Acetaldehyd und Aceton S. 1070.  |       |
| <b>Organische Säuren.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER und Dr. O. WINDHAUSEN-Münster i. W. (Mit 11 Abbildungen) . . . . .   | 1072  |
| I. Allgemeines . . . . .  | 1072  |
| 1. Acidimetrische Bestimmung S. 1072. — 2. Jodometrische Bestimmung S. 1073. — 3. Oxydimetrische Bestimmung S. 1073. — 4. Kennzeichnung der Säuren durch ihre Ester S. 1074.  |       |
| II. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Säuren . . . . .  | 1075  |
| 1. Ameisensäure S. 1075. — a) Nachweis S. 1076. — b) Bestimmung S. 1077.  |       |
| 2. Essigsäure S. 1081. — a) Nachweis S. 1082. — b) Bestimmung S. 1084.  |       |
| 3. Buttersäure S. 1085. — a) Nachweis S. 1086. — b) Bestimmung S. 1088.   |       |
| 4. Oxalsäure S. 1091. — a) Nachweis S. 1091. — b) Bestimmung S. 1093.   |       |
| 5. Bernsteinsäure S. 1095. — a) Nachweis S. 1095. — b) Bestimmung S. 1096.  |       |
| 6. Milchsäure S. 1097. — a) Nachweis S. 1097. — b) Bestimmung S. 1100.  |       |
| 7. Äpfelsäure S. 1104. — a) Nachweis S. 1105. — b) Bestimmung S. 1106.  |       |
| 8. Weinsäure S. 1109. — a) Nachweis S. 1109. — b) Bestimmung S. 1111.   |       |
| Traubensäure S. 1115.   |       |
| 9. Citronensäure S. 1115. — a) Nachweis S. 1116. — b) Bestimmung S. 1119.   |       |
| 10. Benzoesäure S. 1125. — a) Nachweis S. 1126. — b) Bestimmung S. 1128.  |       |
| Derivate der Benzoesäure: 1. p-Oxybenzoesäure S. 1130. — 2. Ester der p-Oxybenzoesäure S. 1131. — 3. p-Chlorbenzoesäure S. 1133.  |       |
| 11. Salicylsäure S. 1135. — a) Nachweis S. 1135. — b) Bestimmung S. 1137.   |       |
| 12. Zimtsäure S. 1139. — a) Nachweis S. 1139. — b) Bestimmung S. 1141.  |       |
| 13. Sonstige Säuren S. 1141. — a) Propionsäure S. 1141. — b) Valeriansäure S. 1142. — c) Fumarsäure S. 1142. — d) Malonsäure S. 1142. — e) Glykolsäure S. 1143. — f) Glyoxalsäure S. 1143. — g) Brenztraubensäure S. 1144. — h) Lävulinsäure S. 1145.   |       |
| III. Nachweis und Bestimmung der organischen Säuren nebeneinander   | 1145  |
| A. Nachweise . . . . .  | 1145  |
| 1. Allgemeiner Gang S. 1146. — 2. Ameisensäure neben Essigsäure S. 1146. — 3. Mikrochemischer Nachweis von Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure S. 1146. — 4. Ameisensäure neben Oxal- und Weinsäure S. 1148. — 5. Mikrochemischer Nachweis von Oxal-, Bernstein-, Äpfel-, Wein- und Citronensäure S. 1148. — 6. Desgleichen von Milch- und Äpfelsäure neben Citronensäure S. 1150. — 7. Äpfel-, Wein- und Citronensäure S. 1151. — 8. Wein- und Citronensäure S. 1152. — 9. Benzoe-, Salicyl- und Zimtsäure S. 1152. — 10. Benzoe-, Salicyl-, Zimt-, p-Chlor- und p-Oxybenzoesäure und deren Ester S. 1153. — 11. Sonstige Verfahren S. 1155. |       |
| B. Bestimmungen . . . . .   | 1156  |
| 1. Flüchtige Säuren durch Destillation S. 1156. — 2. Essig- und Buttersäure S. 1157. — 3. Flüchtige Säuren durch Verteilung zwischen Lösungsmitteln S. 1158. — 4. Ameisen- und Essigsäure S. 1160. — 5. Bernstein-, Äpfel- und Citronensäure S. 1161. — 6. Zimt- und Benzoesäure S. 1168.   |       |
| Anhang: Gerbstoffe . . . . .  | 1169  |
| I. Nachweis . . . . .   | 1170  |
| 1. Fällungsreaktionen S. 1170. — 2. Farbenreaktionen S. 1171. — Mikrochemischer Nachweis S. 1174.   |       |
| II. Bestimmung . . . . .  | 1174  |
| 1. Hauptpulververfahren S. 1174. — 2. Bestimmung als Ferritannat S. 1176. — 3. Bestimmung mit Kupferacetat S. 1176. — 4. Bestimmung mit Zinnchlorür S. 1176. — 5. Colorimetrische Bestimmung S. 1176. — 6. Sonstige Verfahren S. 1177.  |       |
| <b>Farbstoffe.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER und Dr. O. WINDHAUSEN-Münster i. W. (Mit 1 Abbildung) . . . . .   | 1178  |
| I. Chemischer Nachweis von Farbstoffen . . . . .  | 1178  |
| A. Nachweis von Farbstoffgruppen . . . . .  | 1178  |
| 1. Ausfärbverfahren S. 1178. — 2. Ausschüttelungsverfahren S. 1180. — 3. Fällung mit Bleiessig S. 1181. — 4. Behandlung mit Quecksilberoxyd S. 1181. — 5. Bestimmung der elektrolytischen Leitfähigkeit S. 1182.  |       |

|  | Seite |
|--|-------|
| B. Nachweis natürlicher Farbstoffe . . . . .   | 1182  |
| 1. Rote Farbstoffe S. 1183. — 2. Gelbe Farbstoffe S. 1184. — 3. Grüne Farbstoffe S. 1187.  |       |
| C. Nachweis von Caramel . . . . .  | 1188  |
| D. Nachweis von künstlichen Farbstoffen . . . . .  | 1189  |
| 1. Lebensmittelfarbstoffe S. 1190. — 2. Verhalten von künstlichen Farbstoffen gegen Säuren und Alkalien S. 1190. — 3. Nachweis einzelner künstlicher Farbstoffe S. 1191.   |       |
| II. Spektroskopischer Nachweis von Farbstoffen . . . . .   | 1200  |
| 1. Grundlagen der spektroskopischen Untersuchung S. 1200. — 2. Absorptionsspektren natürlicher Farbstoffe S. 1205. — 3. Absorptionsspektren künstlicher Farbstoffe S. 1205.  |       |
| <b>Mineralstoffe.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER und Dr. O. WINDHAUSEN-Münster i. W. (Mit 10 Abbildungen) . . . . .  | 1208  |
| I. Bestimmung der Gesamt-Mineralstoffe. . . . .  | 1209  |
| 1. Bestimmung der Asche . . . . .  | 1209  |
| a) Vorbereitung der Substanz S. 1209. — b) Veraschungsapparaturen S. 1209. — c) Ausführung der Bestimmung S. 1210. — d) Bestimmung der Reinasche S. 1211. — e) Lösung der Kohlensäure der Asche S. 1211. — f) Bestimmung der Alkalität der Asche S. 1215. — g) Bestimmung der Ortho-, Pyro- und Metaphosphate S. 1219. |       |
| 2. Veraschung mit alkalischen Zusätzen . . . . .   | 1220  |
| 3. Aufschließung mit Säuren . . . . .  | 1221  |
| II. Bestimmung der einzelnen Mineralstoffe. . . . .  | 1223  |
| A. Bestimmung der Basen. . . . .   | 1223  |
| 1. Analysengang . . . . .  | 1223  |
| a) Eisen und Aluminium S. 1223. — b) Mangan S. 1225. — c) Calcium S. 1225. — d) Magnesium S. 1225. — e) Kalium und Natrium S. 1225.  |       |
| 2. Bestimmung der einzelnen Kationen . . . . .   | 1226  |
| a) Eisen S. 1226. — b) Aluminium S. 1228. — c) Mangan S. 1231. — d) Calcium S. 1232. — e) Magnesium S. 1233. — f) Kalium S. 1234. — g) Natrium S. 1238.  |       |
| B. Bestimmung der Säuren . . . . .   | 1239  |
| 1. Chlor S. 1240: a) Chlorwasserstoffsäure S. 1240, b) Chlorsäure S. 1241. — 2. Jod S. 1242. — 3. Fluor S. 1245: a) Fluorwasserstoffsäure S. 1246, b) Silicofluorwasserstoffsäure S. 1250. — 4. Schwefelsäure S. 1251. — 5. Schweflige Säure S. 1253. — 6. Phosphorsäure S. 1257. — 7. Borsäure S. 1264.               |       |
| Anhang: Wasserstoffsperoxyd S. 1268. a) Nachweis S. 1269. — b) Bestimmung S. 1270.   |       |
| <b>Ausmittlung der Gifte.</b> Von Professor Dr. A. GRONOVER-Karlsruhe. (Mit 22 Abbildungen) . . . . .  | 1273  |
| Allgemeines . . . . .  | 1273  |
| 1. Vor der Untersuchung zu beachtende Regeln S. 1273. — 2. Vorbereitung zur Untersuchung S. 1274. — 3. Zu verwendende Chemikalien S. 1275. — 4. Isolierung der Gifte S. 1275. — 5. Abfassung des Gutachtens S. 1275. — 6. Giftarten S. 1276.   |       |
| Prüfung auf Gifte durch Vorproben. . . . .   | 1276  |
| I. Mit Wasserdämpfen flüchtiger Gifte . . . . .  | 1277  |
| 1. Phosphor und Phosphorverbindungen . . . . .   | 1279  |
| a) Phosphor S. 1279. — b) Phosphorwasserstoff S. 1286. — c) Phosphorhalogene S. 1287.  |       |
| 2. Blausäure, Cyanide und Rhodanide . . . . .  | 1287  |
| a) Blausäure S. 1287. — b) Cyankohlenstoffsäuremethylester S. 1292. — c) Chlorcyan S. 1292. — d) Dicyan S. 1292. — e) Calciumcyanamid S. 1292.   |       |
| 3. Schwefelkohlenstoff und flüchtige Halogenverbindungen . . . . .   | 1292  |
| a) Schwefelkohlenstoff S. 1294. — b) Chloroform S. 1295. — c) Bromoform S. 1297. — d) Jodoform S. 1297. — e) Chloralhydrat S. 1297. — f) Bromal S. 1299. — g) Sonstige Halogenverbindungen S. 1299.  |       |
| 4. Alkohole . . . . .  | 1299  |
| a) Methylalkohol S. 1300. — b) Äthylalkohol S. 1303. — c) Isopropylalkohol S. 1307. — d) Isoamylalkohol S. 1307. — e) Tertiärer Amylalkohol S. 1308.   |       |

|  | Seite |
|--|-------|
| 5. Aldehyde . . . . .  | 1308  |
| a) Formaldehyd S. 1308. — b) Acetaldehyd S. 1311.  |       |
| 6. Ketone . . . . .  | 1311  |
| a) Aceton S. 1311. — b) Acetophenon S. 1311.   |       |
| 7. Äther . . . . .   | 1311  |
| 8. Phenole . . . . .   | 1311  |
| a) Phenol S. 1312. — b) Kresol und Lysol S. 1315. — c) Kresol und Guajacol S. 1316. — d) Thymol S. 1316. — e) Carvacrol S. 1316. — f) Naphthole S. 1316.   |       |
| 9. Säuren . . . . .  | 1317  |
| a) Ameisensäure S. 1317. — b) Essigsäure S. 1317. — c) Salicylsäure S. 1318.   |       |
| 10. Ester . . . . .  | 1318  |
| 11. Organische Basen . . . . .   | 1318  |
| a) Anilin S. 1318. — b) Methylierte Aniline S. 1319.   |       |
| 12. Nitroverbindungen . . . . .  | 1319  |
| a) Nitrobenzol S. 1319. — b) Nitrotoluole S. 1319.   |       |
| 13. Ätherische Öle . . . . .   | 1319  |
| a) Sadebaumöl S. 1320. — b) Senföl S. 1320.  |       |
| 14. Kohlenwasserstoffe . . . . .   | 1320  |
| a) Petroleum S. 1320. — b) Benzol S. 1321. — c) Naphthalin S. 1321.  |       |
| II. Organische Gifte . . . . .   | 1321  |
| A. Allgemeiner Teil . . . . .  | 1321  |
| 1. Allgemeiner Untersuchungsgang . . . . .   | 1321  |
| 2. Reinigung von Alkaloiden und diesen ähnlichen Giften . . . . .  | 1323  |
| 3. Allgemeine Verfahren des Nachweises . . . . .   | 1325  |
| 4. Allgemeine Alkaloidreaktionen . . . . .   | 1326  |
| 5. Vorprüfung der sauren wäßrigen Lösung . . . . .   | 1326  |
| 6. Untersuchung des alkoholischen Auszuges . . . . .   | 1328  |
| a) Ätherausschüttelung in saurer Lösung 1328. — b) Desgleichen in alkalischer Lösung S. 1329. — c) Untersuchung der alkalischen wäßrigen Lösung S. 1330.   |       |
| B. Nachweis der einzelnen Gifte . . . . .  | 1330  |
| 1. Aus saurer Lösung ausschaltbare Gifte . . . . .   | 1330  |
| a) Bitterstoffe, Purgativa, Drastica S. 1330. — b) Glucoside S. 1333. — c) Saponine S. 1336. — d) Purinabkömmlinge S. 1339.  |       |
| 2. Aus alkalischer Lösung ausschüttelbare Gifte (Alkaloide) . . . . .  | 1339  |
| a) Allgemeine Eigenschaften der Alkaloide S. 1339. — b) Bestimmung der Alkaloide S. 1340. — c) Die einzelnen Alkaloide S. 1341.  |       |
| C. Stark wirkende Arzneimittel und technische Chemikalien . . . . .  | 1366  |
| a) Phenole S. 1366. — b) Säuren: Oxalsäure S. 1367, Schlafmittel S. 1368, Fiebermittel S. 1370, Organische Basen S. 1372.  |       |
| D. Kampfstoffe (Giftgase) . . . . .  | 1375  |
| E. Ptomaine . . . . .  | 1375  |
| a) Allgemeines S. 1375. — b) Darstellung nach BRIEGER S. 1376. — c) Trennung von Diaminen S. 1378. — d) Einige Ptomaine S. 1378.   |       |
| III. Anorganische Gifte . . . . .  | 1380  |
| A. Zerstörung der organischen Substanz . . . . .   | 1381  |
| 1. Nach FRESENIUS-V. BABO S. 1381. — 2. Abänderungen dieses Verfahrens S. 1381. — 3. Nach DENIGÉS S. 1382. — 4. Nach LOCKEMANN S. 1383. — 5. Nach HALENKE S. 1383. — 6. Nach TARUGI S. 1384. — 7. Zerstörung von Knochen S. 1384.  |       |
| B. Allgemeiner Analysengang . . . . .  | 1385  |
| 1. Arsen, Antimon, Zinn S. 1385. — 2. Blei, Silber, Wismut, Kupfer, Cadmium, Quecksilber S. 1387. — 3. Filtrat vom Schwefelwasserstoffniederschlag S. 1388. — 4. Blei, Barium, Strontium, Silber S. 1389.  |       |
| C. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Gifte . . . . .   | 1389  |
| 1. Arsen S. 1389: a) Vorgehen S. 1390; b) Nachweis S. 1392; c) Bestimmung S. 1400. — 2. Antimon S. 1406. — 3. Zinn S. 1407. — 4. Selen S. 1408. — 5. Tellur S. 1408. — 6. Quecksilber S. 1408. — 7. Blei S. 1411. — 8. Thallium S. 1415. — 9. Silber S. 1416. — 10. Wismut S. 1416. — 11. Kupfer S. 1417. — 12. Cadmium S. 1418. — 13. Zink S. 1418. — 14. Chrom S. 1419. — 15. Uran S. 1419. — 16. Barium S. 1420. — 17. Strontium S. 1420. |       |

|   | Seite      |
|---|------------|
| D. Freie Alkalien und Erdalkalien . . . . .   | 1421       |
| 1. Ammoniak und Ammoniumcarbonat S. 1421. — 2. Kalium- und Natriumhydroxyd und -carbonate S. 1422. — 3. Wasserglas S. 1422. — 4. Kalium- und Ammoniumsulfid, Kaliumpolysulfid S. 1422.  |            |
| E. Freie Säuren und freie Halogene . . . . .  | 1422       |
| 1. Kohlensäure S. 1422. — 2. Schwefelwasserstoff S. 1423. — 3. Schweflige Säure S. 1424. — 4. Schwefelsäure S. 1424. — 5. Stickstoffsäuren S. 1424. — 6. Halogenwasserstoffsäuren S. 1425. — 7. Freie Halogene S. 1425.   |            |
| F. Salze . . . . .  | 1426       |
| 1. Alkalichloride S. 1426. — 2. Bromide, Jodide, Fluoride S. 1426. — 3. Borate S. 1427. — 4. Nitrate S. 1428. — 5. Nitrite S. 1428.   |            |
| G. Kohlenoxyd . . . . .   | 1429       |
| Anhang: Reinigung und Prüfung der Reagenzien . . . . .  | 1433       |
| <b>Mathematische Auswertung von Untersuchungsergebnissen.</b> Von Professor Dr. A. TIMPE und Professor Dr. J. GROSSFELD-Berlin. (Mit 6 Abbildungen) . . . . .   | 1438       |
| I. Zuverlässigkeit von Untersuchungsergebnissen und ihre Prüfung . . . . .  | 1438       |
| 1. Genauigkeit der Messungen. Streuung der Beobachtungsfehler . . . . .   | 1438       |
| a) Mittlerer und wahrscheinlicher Fehler S. 1439. — b) Einfluß der Beobachtungsfehler auf das Endergebnis S. 1440.  |            |
| 2. Biologische Streuung . . . . .   | 1441       |
| a) Zuverlässigkeit sog. Grenzzahlen S. 1441. — b) Größe der biologischen Streuung S. 1442.  |            |
| II. Ableitung von Gesetzmäßigkeiten aus den Untersuchungsergebnissen . . . . .  | 1443       |
| 1. Erfassung fehler- und streuungsfreier Untersuchungsergebnisse durch Interpolationsformeln. . . . .   | 1444       |
| 2. Glätten der die Beobachtungsergebnisse darstellenden Kurven . . . . .  | 1448       |
| 3. Korrelationsmethode zum Vergleich zweier natürlicher Funktionen . . . . .  | 1452       |
| <b>Biologische Methoden.</b>  |            |
| <b>Verdaulichkeit der Lebensmittel.</b> Von Professor Dr. A. BÖMER-Münster i. W. . . . .  | 1457       |
| I. Verdauungsversuche am Menschen . . . . .   | 1457       |
| 1. Schwierigkeiten und Mängel der Verdauungsversuche . . . . .  | 1457       |
| 2. Ausführung der Verdauungsversuche . . . . .  | 1460       |
| a) Menge und Zusammensetzung der Nahrung S. 1460. — b) Sammlung und Untersuchung des Kotes S. 1462. — c) Sammlung und Untersuchung des Harnes S. 1463. — d) Berechnung der Ergebnisse S. 1463.  |            |
| II. Künstliche Verdauung . . . . .  | 1465       |
| 1. Vorgänge und Mängel S. 1465. — 2. Ausführung der Bestimmung S. 1465. — 3. Ergebnisse der Bestimmung S. 1466.   |            |
| Anhang: Stoffumsatz und thermische Energie. . . . .   | 1466       |
| 1. Bestimmung des Stoffumsatzes im Respirationsapparat S. 1466. — 2. Bestimmung der thermischen Energie S. 1467.  |            |
| <b>Vitamine.</b> Von Professor Dr. A. SCHEUNERT und Privatdozent Dr. M. SCHIEBLICH-Leipzig. (Mit 47 Abbildungen) . . . . .  | 1469       |
| I. Versuchstiere. . . . .   | 1469       |
| 1. Ratte S. 1470. — 2. Maus S. 1480. — 3. Meerschweinchen S. 1481. — 4. Taube S. 1483.  |            |
| II. Vitamin A . . . . .   | 1484, 1543 |
| 1. Grundlagen der Methodik S. 1484. — 2. Versuchstiere S. 1484. — 3. Käfige S. 1485. — 4. Versuchsraum S. 1488. — 5. Versuchsnahrung S. 1489. — 6. Durchführung des Versuchs S. 1494, 1543. — 7. Nachweis der Wirkung S. 1501. — 8. Toxizität S. 1502. — 9. Antimontrichloridreaktion S. 1502, 1545. — 10. Spektroskopische Methoden S. 1546. |            |
| III. Vitamin D . . . . .  | 1505, 1547 |
| 1. Fütterung S. 1505. — 2. Durchführung des Versuchs S. 1506. — 3. Farbreaktionen S. 1513. — 4. Spektrographischer Nachweis S. 1513. — 5. Toxizität S. 1514.  |            |

|   | Seite      |
|---|------------|
| IV. Vitamin E . . . . .   | 1515, 1548 |
| V. Vitamin B . . . . .  | 1516, 1548 |
| 1. Rattenversuch S. 1516, 1548. — Vitamin B <sub>1</sub> S. 1517. — 2. Taubenversuch S. 1522, 1549. — Vitamin B <sub>2</sub> S. 1526, 1550. — Andere Vitamine der B-Gruppe S. 1527.   |            |
| VI. Vitamin C. . . . .  | 1528, 1551 |
| 1. Versuchsnaohung S. 1528. — 2. Durchführung des Versuches S. 1529. — 3. Skorbutdiagnose S. 1533. — 4. Bewertung des Vitamin-C-Gehaltes S. 1535, 1552. — 5. Titrationsmethode nach TILLMANS S. 1538, 1552. — 6. Schnellmethode zum Nachweis in den Nebennieren S. 1542. — 7. Beurteilung des Vitamin-C-Bestandes im menschlichen Körper S. 1542. — 8. BEZSSONOFFsche Reaktion S. 1543. |            |
| Nachtrag S. 1543.   |            |
| <b>Mykologische Untersuchungen.</b> Von Professor Dr. C. GRIEBEL-Berlin.  |            |
| (Mit 111 Abbildungen). . . . .  | 1555       |
| I. Einrichtung mykologischer Laboratorien. . . . .  | 1556       |
| 1. Arbeitsraum S. 1556. — 2. Brutschränke S. 1557. — 3. Geräte zum Abimpfen S. 1560.  |            |
| II. Sterilisierung (Keimfreimachung) . . . . .  | 1561       |
| III. Nährböden. . . . .   | 1565       |
| 1. Zusammensetzung und Herstellung der wichtigsten Nährböden S. 1567. — 2. Abfüllen und Aufbewahrung von Nährböden S. 1573. — 3. Nährböden für verschiedene Zwecke S. 1574.   |            |
| IV. Reinzüchtung von Bakterien und Eumyceten . . . . .  | 1574       |
| A. Verdünnungsverfahren . . . . .   | 1575       |
| 1. HANSENSches Verfahren S. 1575. — 2. Tröpfchenkultur S. 1575. — 3. Tuschepunktultur S. 1576. — 4. Plattenkulturverfahren S. 1577. —   |            |
| B. Anreicherungsverfahren. . . . .  | 1583       |
| C. Verfahren zur Züchtung an der Luft nicht wachsender (anaerober) Arten  | 1584       |
| 1. Beschränkung des Luftzutritts S. 1585. — 2. Absorption des Sauerstoffs durch Chemikalien S. 1586. — 3. Luftverdünnung S. 1588. — 4. Verdrängung der Luft durch andere Gase S. 1589.  |            |
| D. Anwendung verschiedener Reinzuchtverfahren . . . . .   | 1591       |
| E. Aufbewahrung von Reinkulturen . . . . .  | 1591       |
| V. Keimzählung. . . . .   | 1592       |
| 1. Durch Plattenkulturverfahren S. 1592. — 2. Durch unmittelbare mikroskopische Auszählung S. 1595. — 3. Untersuchung von Keimgemischen S. 1597.  |            |
| VI. Charakterisierung eines Pilzes . . . . .  | 1599       |
| A. Morphologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen . . . . .   | 1599       |
| B. Physiologische Untersuchungen . . . . .  | 1607       |
| 1. Nährstoffbedürfnis und Assimilationsvermögen S. 1607. — 2. Erzeugung von Enzymen S. 1608. — 3. Stoffwechselprodukte S. 1612. — 4. Kardinalpunkte der Temperaturen für Keimung usw. S. 1616. — 5. Tötungszeiten für Sporen und vegetative Formen usw. S. 1617. — Bakteriophagie S. 1617.  |            |
| VII. Systematik der Pilze und Beschreibung der auf Lebensmitteln allgemein verbreiteten Arten . . . . .   | 1618       |
| A. Bakterien . . . . .  | 1618       |
| 1. System von A. FISCHER S. 1619. — 2. Desgleichen von W. MÍGULA S. 1620. — 3. Desgleichen von K. B. LEHMANN und R. O. NEUMANN S. 1622. — 4. In Lebensmitteln verbreitete Bakterien S. 1623.  |            |
| B. Eumyceten . . . . .  | 1625       |
| 1. Vegetative und fruktifikative Organe . . . . .   | 1625       |
| 2. Einteilung der Eumyceten . . . . .   | 1632       |
| a) Phycomyceten S. 1632: Oomyceten S. 1632, Zygomyceten S. 1632.  |            |
| b) Mycomyceten S. 1639: Ascomyceten S. 1639. — c) Hausschwamm S. 1653. — d) Fungi imperfecti S. 1657.   |            |



**Tabellen.**

| Tabelle  | Seite       |
|--|-------------|
| I. Beziehungen zwischen Spezifischem Gewicht, Graden BALLING (BRIX) und Graden BAUMÉ bei 17,5° . . . . . | 1664        |
| II. A. Extrakt-Tabelle (15°/15°) nach K. WINDISCH . . . . .  | 1669        |
| B. Extrakt-Tabelle (20°/4°) nach J. GROSSFELD . . . . .  | 1676        |
| III. Bestimmung der Glucose nach ALLIHN . . . . .  | 1688        |
| IV. Bestimmung des Invertzuckers nach MEISSL . . . . .   | 1690        |
| V. Bestimmung der Maltose nach WEIN . . . . .  | 1691        |
| VI. Bestimmung der Lactose nach SOXHLET . . . . .  | 1692        |
| VII. Bestimmung des Zuckers nach BRUHNS . . . . .  | 1694        |
| VIII. A. Äthylalkohol-Tabelle (15°/15°) nach K. WINDISCH . . . . .                                       | 1697        |
| B. Äthylalkohol-Tabelle (20°/4°) nach J. GROSSFELD . . . . .   | 1704        |
| IX. Refraktion von Äthylalkohol-Wasser-Mischungen bei 17,5° mit Umrechnungstabelle . . . . .             | 1711        |
| X. Atomgewichte der Elemente . . . . .   | 1715        |
| <b>Sachverzeichnis . . . . .</b>   | <b>1716</b> |

# Chemische Methoden.

## Wasser.

Von

Professor **DR. A. BÖMER** und **DR. R. GRAU**-Münster i. W.

Mit 29 Abbildungen.

Das Wasser einer Substanz ist teils sehr locker, teils recht fest gebunden mit allen Zwischenstufen. Diese Bindung kann physikalischer und chemischer Art sein. Adsorption durch große Oberfläche, sog. Capillarwirkung, kann Wasser ebenso fest halten wie manche Salze ihr Krystallwasser. Andererseits wieder geben manche krystallwasserhaltigen Salze, wie krystallisiertes Natriumcarbonat, ihr Wasser schnell und leicht ab; sie verwittern.

Das Verwittern von Salzen mit Krystallwasser beruht auf der Erscheinung, daß das Salz bestrebt ist, sich mit dem Wassergehalt der Luft ins Gleichgewicht zu bringen. Auf das gleiche Prinzip ist es zurückzuführen, daß viele Substanzen aus der Umgebung lebhaft Wasser anziehen. Hier werden stabilere, energieärmere Produkte gebildet. Daher geht eine Wasseraufnahme solcher „hygroskopischen“ Substanzen immer unter starker positiver Wärmetönung vor sich. Ist die Wasseraufnahme in bezug auf Menge und Geschwindigkeit bedeutend, so lassen sich derartige Stoffe als Trockenmittel verwenden.

Einzelbestimmungen der auf verschiedene Art gebundenen Wassermengen sind wegen des Ineinanderfließens der Grenzen unmöglich. Wohl lassen sich grobe Unterschiede wie zwischen in Ölen suspendiertem und gelöstem Wasser oder chemisch und physikalisch gebundenem Wasser angeben. Wünschenswert wäre auch eine Unterscheidung zwischen dem sehr lose festgehaltenem und dem fester gebundenem Wasser. Diese Unterscheidung ist vorläufig noch nicht möglich. Die Wichtigkeit einer solchen Unterscheidung erhellt aus der Tatsache, daß die Verderblichkeit mancher Lebensmittel durch Pilze und Bakterien mit dem Gehalt an locker gebundenem Wasser, der „Feuchtigkeit“, zusammenhängt.

Wegen der Verschiedenartigkeit in der Bindung des Wassers ist es auch verständlich, daß die vielen gebräuchlichen Bestimmungsmethoden untereinander fast nie völlig übereinstimmende Ergebnisse liefern, da die einzelnen Methoden vielfach eine andere Menge Wasser erfassen; in den meisten Fällen handelt es sich daher um konventionelle Methoden. Daraus erklärt sich auch, daß immer wieder neue Verfahren erdacht werden, um die tatsächliche Menge des Wassers zu bestimmen.

Die wichtigste und am meisten gebrauchte Methode der Wasserbestimmung ist die Trocknung bei höheren Temperaturen, etwa 100—110°, in eigens dafür erbauten Trockenschränken, meistens in Verbindung mit dem Gebrauch von Exsiccatoren. Beobachtungen über die nicht vollständige Erfassung des Wassers und manches andere brachten neue, oft sehr elegante Verfahren, von denen besonders das Destillationsverfahren, die Einwirkung von Calciumcarbid und die Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten genannt seien.

## I. Nachweis des Wassers.

Die wichtigsten Methoden zum Nachweise des Wassers sind folgende:

1. Wasserfreies, farbloses Kupfersulfat bindet Wasser unter Bildung der blauen Hydrate des Kupfersulfates. Diese Eigenschaft verwendet man bei farblosen Lösungsmitteln, wie Alkoholen, Äther, Motortreibstoffen usw. Sie versagt aber beim Methylalkohol, der eine leicht lösliche, blaugrüne Verbindung  $\text{CuSO}_4 \cdot 2 \text{CH}_3\text{OH}$  gibt<sup>1</sup>.

2. Die Entwicklung von Wasserstoff auf Zusatz von metallischem Natrium zeigt Wasser an; Natrium wird daher auch zur Entwässerung von Äther benutzt.

3. Die Rotfärbung durch zugegebenes Kaliumpermanganat wird bei Motortreibstoffen verwendet. Ebenso kann wasserfreies Aluminiumchlorid durch Entwickeln von Salzsäuregas Wasser anzeigen.

4. Verfahren von F. SRIBA<sup>2</sup>. Auf einem Filtrierpapierstreifen, der mit einer Lösung von 1 g MOHR'schem Salz in 20 ccm Wasser getränkt und getrocknet ist, verreibt man möglichst fein gepulvertes rotes Blutlaugensalz. Kleinste Wassertröpfchen werden durch einen tiefblauen Fleck kenntlich gemacht.

5. Ein anderer empfindlicher Nachweis fußt auf eine Beobachtung SCHREINEMAKERS<sup>3</sup>, wonach das farblose Kaliumbleijodid ( $\text{KPbJ}_2$ ) in Berührung mit Wasser zum Teil unter Abscheidung von gelbem Bleijodid zerfällt. Nach W. BILTZ<sup>4</sup> stellt man sich ein geeignetes Reagenspapier in folgender Weise her:

Eine Lösung von 4 g Bleinitrat in 15 ccm Wasser vermischt man warm mit einer Lösung von 15 g Kaliumjodid in 15 ccm Wasser. Zuerst scheidet sich dottergelbes Bleijodid ab, das aber wieder verschwindet. Die Masse erstarrt zu einem weißen Brei, der aus den farblosen Nadelchen des Doppelsalzes besteht. Man löst den Brei in 15—20 ccm Aceton auf und verwendet entweder diese Lösung als solche, oder man fällt sie mit Äther zwecks Reinigung des Salzes, das im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet wird. Man trinkt Filtrierpapierstreifen mit einer 20%igen Lösung, befreit die Filter durch Trocknung bei 100—110° vom Wasser und trocknet nochmals intensiv mit einem durch 98%ige Schwefelsäure entwässerten Luftstrom.

Dieses Reagenspapier wird durch Luftfeuchtigkeit gelb; beim Anhauchen nimmt es eine tiefgelbe Färbung an. Eine etwaige Anfärbung läßt sich durch Behandeln mit Aceton wieder zum Verschwinden bringen. Das Doppelsalz läßt sich auch in fester Form zum Nachweis des Wassers verwenden. Spuren von Wasser zeigen sich durch eine sofortige Färbung an, nach einigen Sekunden fällt ein dottergelbes Pulver aus.

6. F. ADICKES<sup>5</sup> weist in Alkoholen Wasser nach durch Zugabe von Natriumäthylat und Äthylformiat; es entsteht eine Fällung von Natriumformiat. Dieser Nachweis gelingt von 0,013% Wasser an aufwärts, ist also recht empfindlich. Das Verfahren wird auch zur quantitativen Bestimmung des Wassers ausgenutzt (S. 562).

7. Die Umsetzung von Calciumcarbid mit Wasser zu Acetylen, die für quantitative Zwecke (S. 557) Verwendung findet, kann auch für den Nachweis des Wassers gebraucht werden<sup>6</sup>. Man läßt das entstandene Acetylen gas sich mit einer geeigneten Kupfer<sup>I</sup>-Salzlösung zu Acetylenkupfer umsetzen. Hierzu benutzt man eine ammoniakalische Kupfer<sup>II</sup>-Lösung, die durch Hydroxylamin reduziert worden ist. An Lösungen können verwendet werden:

<sup>1</sup> L. DE BRUYN: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1893, 11, 112.

<sup>2</sup> F. SRIBA: Zeitschr. physikal. chem. Unterr. 1906, 19, 298; C. 1906, II, 1458.

<sup>3</sup> SCHREINEMAKER: Zeitschr. physikal. Chem. 1892, 9, 57; 10, 467.

<sup>4</sup> W. BILTZ: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1907, 40, 2182.

<sup>5</sup> F. ADICKES: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 2753.

<sup>6</sup> E. R. WEAVER: Journ. Americ. Chem. Soc. 1916, 36, 2462.

Lösung 1: 0,75 g Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), 1,5 g Ammoniumchlorid, 3 ccm Ammoniak (20—21%), 3 g Hydroxylaminchlorhydrat ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ) oder

Lösung 2: 1 g Kupfernitrat ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) oder 1 g Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), 4 ccm Ammoniak, 3 g Hydroxylaminchlorhydrat ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ).

Das Kupfersalz wird in wenig Wasser gelöst, Ammoniak und Hydroxylaminchlorhydrat werden hinzugefügt und die Lösung auf 50 ccm aufgefüllt. Die verwendeten Calciumcarbidstückchen werden vorher durch ein- oder zweimaliges Auskochen mit wasserfreien Lösungsmitteln für Acetylen (Benzin, Äther, Methyl-, Äthyl-, Amylalkohol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff) ausgekocht, da immer etwas Acetylen vom Carbid eingeschlossen ist. Die Substanz wird mit den oben genannten Lösungsmitteln und einigen Carbidstücken versetzt und das Ganze geschüttelt. Nach dem Absitzenlassen wird die klare Lösung in die Kupferlösung gegossen; noch weniger als 0,1 mg Wasser zeigen sich durch Ausscheidung von rotem Acetylenkupfer ( $\text{Cu}_2\text{C}_2$ ) an.

8. H. OERTEL<sup>1</sup> gibt zu Fetten und Ölen, die auf Anwesenheit von Wasser geprüft werden sollen, ein Wasser unter Wärmeentwicklung bindendes Salz, z. B. wasserfreies Magnesiumsulfat, hinzu; eine Temperaturerhöhung zeigt Wasser an.

Die Entwicklung von Gasen durch Zugabe irgendwie geeigneter Stoffe zu wasserhaltigen Substanzen wird in einem Patente von M. BUCHHOLZ<sup>2</sup> zur Bestimmung von Wasser in Isolierölen verwertet. Die aufsteigenden Gasblasen setzen in einer geeigneten Apparatur eine Kontakteinrichtung in Tätigkeit.

## II. Bestimmung des Wassers.

In den meisten praktischen Fällen der Lebensmitteluntersuchung handelt es sich nicht um den Nachweis des Wassers, sondern um die Bestimmung seiner Menge.

### A. Wasserbestimmung aus dem Trocknungsverlust.

Man entzieht wasserhaltigen Substanzen das Wasser entweder durch erhöhte Temperatur oder durch Anwendung eines Vakuums oder durch beide zusammen mehr oder weniger schnell. Die Geschwindigkeit der Wasserabgabe kann man durch Überleiten von Luft oder anderen Gasen oder auch durch Vermengung der Substanz mit Alkohol beschleunigen. Der Gewichtsverlust gibt die Menge Wasser an.

Hinsichtlich der Brauchbarkeit dieser einfachen Vorschrift muß aber eine Reihe von Einschränkungen beachtet werden:

- a) Die Stoffe dürfen beim Erhitzen keine wesentlichen Veränderungen erfahren.
- b) Es darf keine Abgabe von Kohlensäure oder anderen flüchtigen Stoffen stattfinden. Bei 100° verliert eine Reihe von Lebensmitteln nicht nur Wasser, sondern auch Alkohole, flüchtige organische Säuren, ätherische Öle, Kohlensäure usw.
- c) Es darf keine wesentliche Oxydation stattfinden.
- d) Es dürfen keine mit Gewichtsverlust einhergehenden Umsetzungen eintreten.
- e) Es darf keine Kohlensäure absorbiert werden. Manche Salze schwacher flüchtiger Säuren absorbieren Kohlensäure und setzen die Säuren in Freiheit.
- f) Infolge chemischer Umsetzungen darf kein Wasser neu gebildet werden; bei Temperaturen bis 110° ist eine solche Neubildung von Wasser aber selten.

Sind diese Bedingungen im großen und ganzen erfüllt, so sind beträchtliche Fehler bei dieser Art der Wasserbestimmung nicht zu befürchten.

### 1. Trockentemperaturen.

Wie bereits oben hervorgehoben wurde, trocknet man bei der Wasserbestimmung aus dem Trocknungsverlust die Substanz meist in Trockenschränken bei 100—110°, in der Regel bei 105° bis zur Gewichtskonstanz.

<sup>1</sup> H. OERTEL: Chem.-Ztg. 1928, 52, 92.

<sup>2</sup> M. BUCHHOLZ: DRP 477 639; C. 1929, II, 1371.

Bei dieser Art der Trocknung kommt man jedoch bei den meisten Lebensmitteln, auch wenn die oben unter a—f angegebenen Bedingungen im großen und ganzen erfüllt sind, nicht zu einem vollständig konstanten Gewicht des Trockenrückstandes, sondern bei weiterem Trocknen treten in der Regel noch längere Zeit geringere Gewichtsabnahmen ein, und zwar meist unter zunehmender Dunkelfärbung — bei weißen Substanzen Braunfärbung — des Trockenrückstandes. Man trocknet daher solche Substanzen nicht bis zum konstanten Gewicht, sondern nur bis zur konstanten Gewichtsabnahme<sup>1</sup>. Hat man z. B. bei 5 g Einwaage bei aufeinanderfolgenden Trocknungen gefunden:

|                     | Nach 2 | 3      | 4      | 5      | 6 Stunden |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| Gewichtsverlust:    | 0,4000 | 0,4205 | 0,4220 | 0,4235 | 0,4245 g  |
| Also die Differenz: | 20,5   | 1,5    | 1,5    | 1,0 mg |           |

so ist in diesem Falle der Trockenverlust nach 3 Stunden als maßgebend anzusehen, und es ergibt sich damit ein Wassergehalt von  $\frac{0,4205 \times 100}{5} = 8,41\%$ .

Im allgemeinen dürfte eine Trockenzeit von 3—6 Stunden ausreichend sein.

Oft erzielt man eine weniger fehlerhafte Trocknung durch kurzdauernde Erwärmung bei höheren Temperaturen als durch längere Trockenzeit bei niedrigeren Temperaturen, wie dies von F. T. BIRCHARD<sup>2</sup> bei Getreidekörnern und von S. H. MEIHZEN<sup>3</sup> bei Milchpulver, Käse, Runkelsamen, Tee nachgewiesen ist. Auch durch das bei gewöhnlichen Trockenschränken übliche Überleiten nicht getrockneter Luft lassen sich die letzten Reste von Wasser nur sehr schwer entfernen. Dagegen läßt sich durch Überleiten getrockneter Luft oder inerte, getrockneter Gase die Trocknung oft wesentlich beschleunigen.

Bei Substanzen, die sich bei 100—110° zersetzen, trocknet man bei niedrigeren Temperaturen im Vakuum (S. 548) oder sogar bei Zimmertemperatur mit Hilfe von sog. Trockenmitteln (S. 546) in Exsiccatoren.

## 2. Trockenapparate.

Als Apparate zur Trocknung finden vorwiegend Trockenschränke und Exsiccatoren, gelegentlich auch sonstige Apparate (Trockenröhren) Verwendung.

### a) Trockenschränke.

An Trockenschränke für die Wasserbestimmung müssen folgende Anforderungen gestellt werden: Sie müssen gut schließen und die eingestellte Temperatur konstant halten. Ferner muß die Temperatur in allen Teilen des Schrankes möglichst gleichmäßig sein (Thermoregulatoren S. 544). Die Luft darf im Trockenschrank nicht stagnieren, sondern sie muß zirkulieren. Dies kann nicht durch einfache „Türventilation“ geschehen, sondern muß durch geeignet angebrachte Ventilationsklappen erfolgen.

Die Erzeugung der Wärme kann durch Gasheizung, durch den elektrischen Strom oder durch die Dämpfe geeigneter Heizflüssigkeiten erfolgen. Einige Trockenschränke besitzen Vorrichtungen zum Durchleiten getrockneter Gase, andere wieder sind zur Erreichung eines Vakuums eingerichtet.

Die Trockenschränke bestehen aus Eisen-, Kupfer- oder Aluminiumblech mit oder ohne äußere Asbestbekleidung.

R. FÄNDER<sup>4</sup> behauptet, daß in gußeisernen, innen und außen säurebeständig emaillierten Schränken die Temperatur besser konstant gehalten werden kann als in solchen aus gewöhnlichem Eisenblech. Dadurch, daß die Temperatur längere Zeit anhält, tritt nach seiner Ansicht auch eine nicht unwesentliche Gasersparnis ein. Bei Verwendung von Kupfer als

<sup>1</sup> Bei manchen Substanzen, z. B. bei trocknenden Ölen, tritt bei längerem Erwärmen wieder eine Zunahme des Gewichtes ein; in solchen Fällen ist der größte Gewichtsverlust für die Berechnung des Wassergehaltes maßgebend.

<sup>2</sup> F. T. BIRCHARD: Journ. Soc. chem. Ind. 1918, **37**, 263; C. 1919, II, 186.

<sup>3</sup> S. H. MEIHZEN: Chem. Weekbl. 1928, **25**, 494.

<sup>4</sup> R. FÄNDER: Chem.-Ztg. 1913, **37**, 1349.

Schrankmaterial bedient man sich zweckmäßig einer starken Prellplatte, um die Flammengase von den dünnen Kupferblechen entfernt zu halten.

Um die Temperatur im Trockenschrank möglichst gleichmäßig zu verteilen, sind alle möglichen Vorschläge gemacht worden: Durchleiten der Verbrennungsgase, Durchleiten vorher erwärmter Luft, Anbringung von Wärmeverteilern am Boden des Schrankes (O. S. WATKINS<sup>1</sup>).

Die zur Wasserbestimmung empfohlenen Trockenschränke sind so zahlreich und vielgestaltig, daß hier nur einige von ihnen Erwähnung finden können.

α) Trockenschränke mit Gasheizung. Die einfachsten Trockenschränke besitzen einfache Wandungen und nur einen Trockenraum; hierher gehören die Schränke nach FRESSENIUS, RÜDORFF<sup>2</sup>, die aus starkem Eisen-, Kupfer- und Aluminiumblech hergestellt werden. Um verschiedene Substanzen getrennt trocknen zu können, sind einige Trockenschränke in mehrere Fächer eingeteilt (Trockenschrank nach GRETE).

Doppelwandige Trockenschränke verdienen gegenüber denen mit einfachen Wandungen schon aus dem Grunde den Vorzug, weil die Temperatur in ihnen besser konstant gehalten werden kann. Die Abstrahlung in die Umgebung ist durch die isolierenden Luftschichten herabgesetzt, so daß sich auch eine Gasersparnis erzielen läßt.

Viel verwendet werden die doppelwandigen Trockenschränke nach A. HERZFELD<sup>3</sup>, R. MUENCKE<sup>4</sup>, FRERICHS<sup>5</sup>, bei denen die Heizgase durch die Zwischenräume der Wände geführt werden und infolgedessen die zu trocknende Substanz nicht beeinflussen können; die Luftzirkulation in dem Trockenraum wird durch besondere Vorrichtungen bewerkstelligt. Zur besseren Isolierung sind bei dem Apparate von R. MUENCKE die Außenflächen mit einem festanliegenden Asbestmantel bekleidet und bei dem Apparat nach FRERICHS bestehen die Wandungen ganz aus Asbestschieferplatten. Ähnliche Einrichtungen besitzen die Trockenschränke von KÄHLER und MARTINI<sup>6</sup>, H. und M. OESINGER<sup>7</sup>, A. STÄHLER<sup>8</sup>, C. HÜLSENBECK<sup>9</sup>, G. WEISSENBERGER<sup>10</sup>, A. E. FRIEDRICH<sup>11</sup> u. a.<sup>12</sup>

Die meisten Trockenschränke besitzen an der oberen Seite Stützen, die zur Aufnahme von Thermometern, Thermoregulatoren (S. 544) und zum Austritt der Heizluft dienen.

Die Heizung erfolgt meist von unten her durch Schlangen-, Rohr- oder Pilzbrenner. FR. KÖHLER<sup>13</sup> hat einen Trockenschrank konstruiert, bei dem sich die Heizquelle im Inneren des Kastens befindet. Dabei soll die Isolierung des Schrankes fortfallen können.

Die Trockenschränke sind entweder mit Füßen zur Aufstellung auf Tischen oder mit Ösen zum Aufhängen an die Wand versehen. F. HAHN<sup>14</sup> gibt einen Trockenschrank aus Aluminium an, der an jedem Stativ befestigt werden kann.

Die Gefäße zur Aufnahme der zu trocknenden Substanz stehen meist auf durchlochtem Einlegeplatten aus demselben Metall, aus dem die Schrankwandungen bestehen. Um auch die durch die Trockengefäße verschlossenen Löcher freizuhalten, was einer gleichmäßigen

<sup>1</sup> O. S. WATKINS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1908, 50, 1240; C. 1908, II, 1314.

<sup>2</sup> RÜDORFF: Chem.-Ztg. 1885, 9, 1225.

<sup>3</sup> A. HERZFELD: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1893, 132.

<sup>4</sup> R. MUENCKE: Chem.-Ztg. 1886, 10, 21; Zeitschr. angew. Chem. 1921, 34, 7.

<sup>5</sup> Der Trockenschrank wird von der Firma Franz Hugerhoff in Leipzig hergestellt.

<sup>6</sup> KÄHLER u. MARTINI: Zeitschr. angew. Chem. 1899, 710.

<sup>7</sup> H. u. M. OESINGER: Chem. Zentralbl. 1900, II, 886 u. 887.

<sup>8</sup> A. STÄHLER: Chem.-Ztg. 1909, 33, 903.

<sup>9</sup> C. HÜLSENBECK: Chem.-Ztg. 1910, 34, 204.

<sup>10</sup> G. WEISSENBERGER: Chem. Apparatur 1914, 1, 241; C. 1914, II, 1293.

<sup>11</sup> A. E. FRIEDRICH: Chem. Zentralbl. 1922, IV, 358.

<sup>12</sup> Trockenapparate zur Schnellbestimmung des Wassergehaltes namentlich in technischen Betrieben haben A. FORNET (Chem.-Ztg. 1913, 37, 1400) und S. H. MEIJHUIZEN (Chem. Zentralbl. 1923, II, 708) angegeben. Vgl. dazu auch K. MOHS (Chem.-Ztg. 1922, 46, 649) und E. H. VOGELENZANG (Pharm. Weekbl. 1922, 59, 732).

<sup>13</sup> FR. KÖHLER: Chem. Zentralbl. 1927, I, 501.

<sup>14</sup> F. HAHN: Chem.-Ztg. 1928, 52, 975.

und ungehinderten Luftbewegung förderlich ist, stellt die Firma F. M. LAUTENSCHLÄGER<sup>1</sup> Einlegeplatten mit Durchlochungen und eingepreßten Erhöhungen her. Die Trockengefäße stehen dabei auf den Erhöhungen und lassen die Öffnungen für den Durchtritt der Luft frei.

Zum Trocknen im Strom inerter Gase, wie Kohlensäure, Wasserstoff, Stickstoff und im Vakuum dient ein von K. VOIGT<sup>2</sup> angegebener Apparat (Abb. 1), der sich besonders für Substanzen eignet, die leicht oxydierbar sind. Der Gasstrom, der bei *b* eintritt, wird durch die Heizgase genügend vorgewärmt und gelangt dann in das eigentliche Trockenrohr. Soll das Rohr evakuiert werden, so wird der Hahn *h* geschlossen und in *a* die Pumpe angelegt.

β) Trockenschränke mit elektrischer Heizung. Dort, wo ein billiger elektrischer Strom verfügbar ist, läßt sich die Gasheizung sehr vorteilhaft durch eine elektrische Heizung ersetzen, die bequemer und sauberer ist. Die Heizung erfolgte anfangs (TH. W. RICHARDS, 1899) durch Glühlampen oder Platinwiderstände, wird aber heute fast ausschließlich durch Widerstandsdrähte, die an den Seiten und an der unteren Wand des Kastens angebracht sind, getätigt. Im übrigen ist das Prinzip dieser Trockenschränke das gleiche wie das der mit Gas beheizten Schränke.

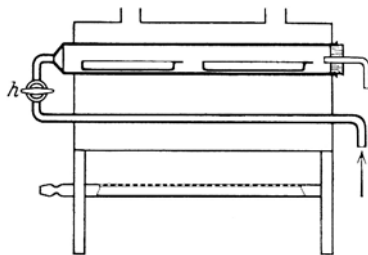


Abb. 1. Vakuum-Trockenschrank nach K. VOIGT.

Neuerdings werden auch die älteren Systeme der Trockenschränke, z. B. der nach FRESSENIUS u. a. mit elektrischer Heizvorrichtung geliefert. Gut bewährt hat sich

unter anderen der elektrisch geheizte Trockenschrank mit einstellbarer Temperatur von W. C. Heraeus-Hanau.

γ) Dampf-Trockenschränke. Die gewöhnlichen Dampftrockenschränke arbeiten derart, daß der Dampf einer siedenden Flüssigkeit, meistens Wasser, den Trockenraum umspült; die Dämpfe werden durch einen aufgesetzten Kühler wieder kondensiert. Die Anordnung des Kühlers ist derart, daß das Kondensat beim Herabtropfen nicht den Innenraum berührt<sup>3</sup>. Ein Wasserstandsglas zeigt die Höhe des Wasserstandes an. Die sonstige Einrichtung ist die der gewöhnlichen doppelwandigen Trockenschränke mit Gasheizung.

Bei der Verwendung von Wasser kann natürlich nie die Temperatur von 100° im eigentlichen Trockenraum erreicht werden. Man kann zwar durch Benutzung geeigneter Salzlösungen als Heizflüssigkeit den Siedepunkt, mithin auch die Temperatur des Innenraumes heraufsetzen (M. C. SCHUYTEN<sup>4</sup>), man hat aber schon früh versucht, mit Wasser allein auszukommen.

Dieser Zweck wird in dem von K. ULSCH<sup>5</sup> angegebenen Trockenschrank (Abb. 2) erreicht und zwar durch einen seitlich angebrachten, mit Quecksilber gefüllten Thermoregulator, der gleichzeitig als Manometer dient. Es wird also ein geringer Überdruck erzeugt, der den Siedepunkt des Wassers erhöht.

Der Schrank selbst ist doppelwandig und besitzt neben dem großen Trockenraum *a* zwischen den Wandungen noch vier unter sich getrennte Heizrohre, die zur Trockensubstanzbestimmung mitbenutzt werden können. Diese Rohre umgeben den Trockenraum *a* von drei Seiten. Durch den Hahn *b* wird der Apparat mit Wasser beschickt. Wenn das Wasser zum Sieden gebracht ist, wird der Hahn *c* geschlossen und der Schrank ist gebrauchsfähig.

<sup>1</sup> LAUTENSCHLÄGER: D. R. P. 429, 803; C. 1926, II, 1078.

<sup>2</sup> K. VOIGT: Chem.-Ztg. 1905, 29, 691.

<sup>3</sup> V. MEYER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1885, 18, 2999. — C. LONNES: Chem.-Ztg. 1893, 17, 502. — H. u. M. OESINGER: C. 1900, II, 886.

<sup>4</sup> M. C. SCHUYTEN: Chem.-Ztg. 1897, 21, 1049.

<sup>5</sup> K. ULSCH: Chem.-Ztg. 1895, 19, 1183.

fertig. Die Höhe der Trockentemperatur liegt um so mehr über  $100^{\circ}$ , je höher die Quecksilbersäule des Manometers ist; bei 30 cm Höhe beträgt die Temperatur in den Trocknröhren  $105^{\circ}$ .

Auf demselben Prinzip beruhen die von F. GANTHER und A. GERLACH beschriebenen Trockenschränke. Der GERLACHSche Schrank arbeitet vorzüglich und ist für größere Laboratorien geeignet.

Zur Inbetriebsetzung wird der Wasserraum etwa zu einem Viertel mit Wasser gefüllt und der Gasbrenner angezündet. Der obere Hahn bleibt so lange geöffnet, bis Dampf daraus entströmt und das Thermometer etwa  $96-97^{\circ}$  zeigt. Dann erst darf der Hahn geschlossen und der Regulator mittels der Schraube nach Wunsch eingestellt werden. Der Apparat arbeitet mit etwa  $\frac{1}{10}$  Atmosphäre Überdruck. Der Schrank bedarf keiner Nachfüllung, da der Dampf nicht entweichen kann; er ist aus starkem Kupferblech gearbeitet; die doppelten Wände sind durch zahlreiche starke Niete zusammengehalten, so daß der Überdruck leicht ausgehalten wird. Außen ist der Schrank mit Linoleum bekleidet.

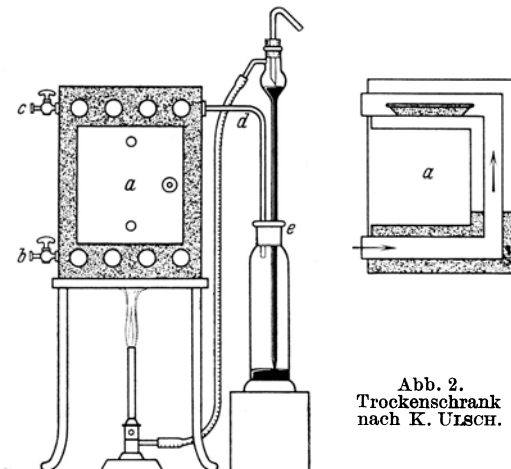


Abb. 2.  
Trockenschrank  
nach K. ULSCH.

Einen Trockenschrank, der für kleinere Betriebe zu empfehlen ist, zeigt Abb. 3. Die Maße des Trockenraumes betragen je 15 cm. Die Trockentemperatur kann auf  $100-110^{\circ}$  eingestellt werden.

Die selbstschließende Klapptür macht die Handhabung bequem und sicher. Die herabgeklappte Tür kann als Abstellisch für die Trockengefäße dienen. Die gleichbleibende Temperatur wird erzielt durch die Verwendung von überhitztem Wasserdampf, welcher im Mantelraum des Schrankes erzeugt und durch einen Thermoregulator in gleichbleibender Spannung erhalten wird, wie sie der gewünschten Temperatur entspricht. Um beim Erkalten des Trockenschrankes infolge der Kondensation des Wasserdampfes ein Vakuum zu vermeiden, ist ein Luftventil angebracht, durch welches Luft eingesaugt wird. Der Thermoregulator ist mit Quecksilber gefüllt, die genaue Menge Quecksilber (etwa 250 g), welche zur Erzielung der vorgeschriebenen Temperatur nötig ist, ist am Apparat vermerkt. Durch Hinzufügen von je etwa 8 g Quecksilber kann die Temperatur um  $1^{\circ}$  erhöht werden; eine Verminderung der angeschriebenen Menge ist nicht statthaft. Der Schrank wird mit etwa  $1\frac{1}{2}$  Liter Wasser gefüllt. Die gewünschte Temperatur wird erst dann erreicht, wenn die im Schrank befindlichen Substanzen ihr Wasser annähernd verloren haben. Solange noch eine lebhafte Verdampfung stattfindet, hat zwar der Heizdampf die verlangte Temperatur, nicht aber der Innenraum, der etwas zurückbleibt, weil die zugeführte Wärme zur Verdunstung des Wassers der Substanz verwendet wird. Eine besondere Anordnung gestattet die Einstellung des Regulators durch einen Handgriff auf beliebige Temperaturen zwischen  $100^{\circ}$  und  $110^{\circ}$ . Dabei ist zu beachten, daß während des Betriebes wohl eine Einstellung auf höhere Temperatur ohne weiteres zulässig ist, eine solche auf niedrigere Temperatur jedoch nur, nachdem durch Ablassen von Dampf der gewünschte Druck unterschritten ist.

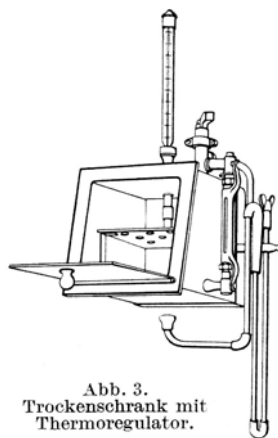


Abb. 3.  
Trockenschrank mit  
Thermoregulator.

Andere Heizflüssigkeiten. Statt des Wassers werden zur Füllung von Dampf-Trockenschränken auch andere Flüssigkeiten von bestimmtem Siedepunkt gewählt. Die Siedepunkte betragen z. B. bei



|   |      |                      |        |
|---|------|----------------------|--------|
| Chloroform . . . . .                          | 61°  | Pyridin . . . . .    | 116,7° |
| Äthylalkohol . . . . .                        | 78°  | Xylol . . . . .      | 139°   |
| Benzol . . . . .                              | 80°  | Brombenzol . . . . . | 155°   |
| Gesättigte NaCl-Lösung <sup>1</sup> . . . . . | 107° | Anilin . . . . .     | 182°   |
| Toluol . . . . .                              | 110° | Naphthalin . . . . . | 218°   |

## Flüssigkeitsgemische

|  |     |                                     |      |
|--|-----|-------------------------------------|------|
| Methyl- : Äthylalkohol = 3 : 7 . . . . .   | 70° | Toluol : Xylol = 1 : 1 . . . . .    | 121° |
| Äthyl- : Propylalkohol = { 7 : 4 . . . . . | 80° | Glycerin : Wasser = 3 : 1 . . . . . | 121° |
| { 1 : 8 . . . . .                          | 90° | Xylol : Cumol = 1 : 1 . . . . .     | 151° |

## Glycerin-Wassergemische

|  |  |
|--|--|
| Glycerin, 70% (Spez. Gew. $\left(\frac{15^{\circ}}{15^{\circ}}\right)$ 1,185) 113,6° | Glycerin, 55% (Spez. Gew. $\left(\frac{15^{\circ}}{15^{\circ}}\right)$ 1,143) 107,5° |
| „ 65% ( „ „ „ 1,171) 111,3°  | „ 50% ( „ „ „ 1,129) 106,8°  |
| „ 60% ( „ „ „ 1,157) 109,0°  | „ 45% ( „ „ „ 1,115) 105,0°  |

Alle bis jetzt beschriebenen Dampf-Trockenschränke entfernen die mit Wasserdampf beladene Luft des Innenraums nur durch die thermische Luftzirkulation. Bei Stoffen, die das Wasser hartnäckig zurückhalten, trocknet man im Luftstrom oder in einem Strom inerter Gase wie Stickstoff, Wasserstoff oder Kohlensäure.

Ein hierfür geeigneter Apparat ist der Dampf-Trockenschrank von W. GALLENKAMP<sup>2</sup> (Abb. 4).

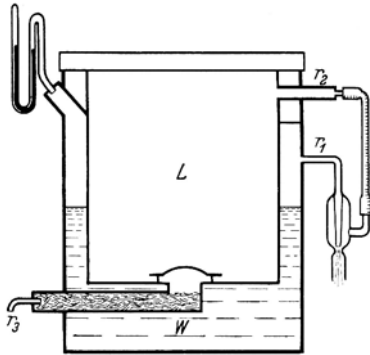


Abb. 4. Dampftrockenschrank nach W. GALLENKAMP.

In dem Trockenschrank ist *W* das Wasserbad und *L* der Trockenraum. Der Wasserdampf, der durch ein Manometer unter Überdruck steht, entweicht durch das Rohr *r*<sub>1</sub>, das in einer der Wasserstrahlpumpe ähnlichen Anordnung endigt. Dadurch zieht der herausströmende Wasserdampf durch das Rohr *r*<sub>2</sub>, das mittels eines Schlauches mit der als Pumpe wirkenden Vorrichtung verbunden ist, die Luft aus dem Innenraum heraus, die ihrerseits wieder durch die Zuführung *r*<sub>3</sub> ersetzt wird. Diese Frischluft wird durch konzentrierte Schwefelsäure getrocknet und durch einen mit Kupferspänen gefüllten Kanal vorgewärmt.

Um ein Konstanthalten des Wasserniveaus zu sichern, ist, abgesehen von den älteren Anordnungen mit Hilfe einer MARIOTTESchen Flasche, die auch dort noch in Anwendung ist, wo keine Wasserleitung zur Verfügung steht, die von den Wasserbädern mit konstantem Niveau her bekannte Einrichtung sehr vorteilhaft.

Bei Anwendung von Leitungswasser als Heizflüssigkeit setzt sich je nach der Härte des Wassers mehr oder weniger Kesselstein ab. Daher sind viele Wasserbad-Trockenschränke mit abnehmbarem Unterteil, zwecks Reinigung, versehen.

Ferner sind Schutzgeräte gegen das Austrocknen von Trockenschränken erdacht, die darauf beruhen, daß mit dem Absinken des Wasserspiegels im Trockenschrank eine mit Quecksilber gefüllte, ausbalancierte Glasbirne schließlich die Gaszufuhr abschneidet (L. L. DE KONINCK<sup>3</sup>).

**Thermoregulatoren.** Für alle Trockenschränke mit Gas- oder elektrischer Beheizung ist die Temperaturkonstanz eine wichtige Forderung. Wohl läßt sich durch dauernde Beobachtung von Flammgröße bzw. Widerstand und Temperatur der Punkt finden, an dem die Temperatur die gewünschte Höhe innehält. Aber diese primitive Anordnung ist ja nur zufällig und im Augenblick richtig. Jede Änderung im Gasdruck bzw. Stromnetz, jede Schwankung der Außentemperatur, die wegen der Strahlung des Trockenschranke von großem Einfluß ist, macht die mühselig erreichte Konstanz für längere

<sup>1</sup> Gewöhnliche Trockenschränke werden bei Anwendung von Kochsalzlösungen an den Lötstellen angegriffen und dadurch leicht undicht.

<sup>2</sup> W. GALLENKAMP: Chem.-Ztg. 1902, 26, 249.

<sup>3</sup> L. L. DE KONINCK: Bull. Soc. Chim. Belgique 1908, 22, 192; C. 1908, II, 369.

Zeit illusorisch. Man verwendet daher zur Konstanthaltung der Temperatur besondere Apparate, sog. Thermoregulatoren.

Für gasbeheizte Schränke bestanden früher Gasdruckregulatoren, die die Temperaturschwankungen bei Änderung des Gasdruckes verhinderten. Solche

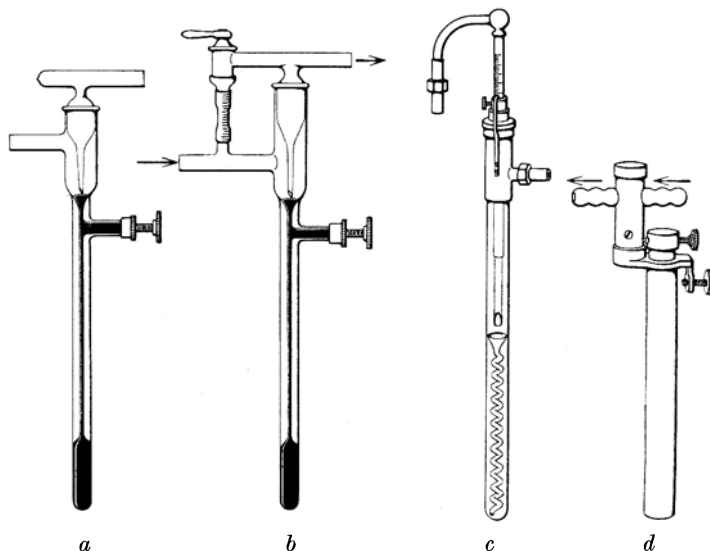


Abb. 5. Thermoregulatoren. *a* u. *b* nach REICHERT, *c* u. *d* nach HUGERSHOFF.

Gasdruckregulatoren sind heute kaum mehr in Gebrauch und durch die eleganten Thermoregulatoren verdrängt. Diese beruhen darauf, daß die sich ausdehnende oder zusammenziehende Luft im Innern eines Trockenschrankes ein Quecksilberventil schließt oder öffnet, wodurch der Gastrom, der dieses Ventil durchströmt, unterbunden wird oder durchtreten kann. Bei den neuesten Thermoregulatoren sorgt eine Nebenleitung dafür, daß nicht völliges Verlöschen der Flamme eintritt.

Der erste praktisch brauchbare Thermoregulator war der von K. ULSCH<sup>1</sup> (Abb. 2). F. FRIEDRICHS<sup>2</sup> hat einen Regulator hergestellt, der in seiner Form den heutigen Apparaten schon sehr ähnelt; er besitzt insofern zwei wesentliche Vorzüge vor dem von ULSCH, daß er erstens im Innern des Schrankes angebracht werden kann, also viel unmittelbarer wirkt, und zweitens die Einstellvorrichtung in der Anwendung sehr einfach ist.

Einige der heute gebräuchlichsten Thermoregulatoren sind in der Abb. 5 wiedergegeben, nämlich die Regulatoren nach REICHERT ohne (*a*) und mit Hahn (*b*), nach HUGERSHOFF mit Bleirohrverschraubung (*c*) und aus Metall für getrennten Behälter für Gasdurchgang und Wärmelement (*d*).



Abb. 6. Thermoregulator nach OSTWALD.

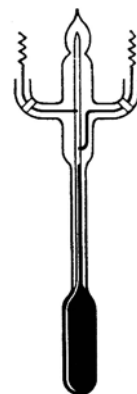


Abb. 7. Thermoregulator nach VAN'T HOFF und MEYERHOFFER.

<sup>1</sup> K. ULSCH: Zeitschr. ges. Brauwesen 1890, 13, 373; C. 1890, I, 683.

<sup>2</sup> F. FRIEDRICHS: Zeitschr. analyt. Chem. 1898, 36, 674.

Um die Temperaturschwankungen auf ein Mindestmaß zurückzudrängen, ist den Thermoregulatoren nach W. OSTWALD noch ein besonders großes Flüssigkeitsreservoir vorgeschaltet, das mit Toluol oder einer Chlorcalciumlösung gefüllt ist (Abb. 6).

Die Thermoregulatoren können auch für elektrisch beheizte Trockenschränke gebraucht werden; der entstehende Stromschluß bei steigender Quecksilbersäule öffnet durch ein Relais gleichzeitig den Heizstrom (Abb. 7).

Sehr oft verwendet man für elektrische Trockenschränke Bimetall-Thermoregulatoren. Die ungleichmäßige Ausdehnung zweier verschiedener, zu einer Feder vereiniger Metallstreifen bedingt eine Durchbiegung der Feder, wodurch Kontakte gelöst bzw. geschlossen werden, die wiederum den Heizstrom schließen oder öffnen; sie werden meist in fester Metallhülle geliefert.

Es existiert noch eine Reihe anderer Thermoregulatoren, auf die hier aber nicht eingegangen werden kann.

### b) Exsiccatoren.

Von Substanzen, die bei 100° außer Wasser auch noch erhebliche Mengen flüchtiger Stoffe verlieren oder sich beim Trocknen in Luft bei 100° zersetzen, wie Gewürze, Auszüge hieraus usw., kann der Wassergehalt nicht durch einfaches Trocknen bei 100—110° bestimmt werden, sondern es bedarf hier anderer Methoden. Man trocknet bei gewöhnlicher oder etwas erhöhter Temperatur, bei gewöhnlichem oder vermindertem Druck über geeigneten Trockenmitteln in Exsiccatoren oder Trockenröhren.

Da beide Einrichtungen indessen in ausgedehntem Maße auch für die Trocknung schlechthin bzw. zur Erzeugung eines vom Wasserdampf befreiten, trockenen Raumes eine große Rolle spielen, seien an dieser Stelle Trockenmittel, Exsiccatoren und Trockenröhren näher beschrieben.

a) Trockenmittel. Nach J. H. YOЕ<sup>1</sup> sind die an ein Trockenmittel zu stellenden Anforderungen folgende:

1. Hohe Wirksamkeit, d. h. schnelle Wasseraufnahme, 2. hohe Kapazität, d. h. Absorption von möglichst viel Wasser, 3. Kontraktion bei der Wasseraufnahme, 4. Wirksamkeit auch bei höheren Temperaturen, 5. Neutralität, 6. keine Zähflüssigkeit, 7. Möglichkeit einer Regeneration, 8. Billigkeit.

Ordnet man die Trockenmittel nach der Erfüllung der ersten Anforderung an, so erhält man nachstehende Reihenfolge: Phosphorpentoxyd ( $P_2O_5$ ), Magnesiumperchlorat ( $Mg[ClO_4]_2$  und  $Mg[ClO_4]_2 \cdot 3 H_2O$ ), geschmolzenes Kaliumhydroxyd (KOH), Aluminiumoxyd ( $Al_2O_3$ ), Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ), Magnesiumoxyd (MgO), geschmolzenes Natriumhydroxyd (NaOH), Calciumbromid ( $CaBr_2$ ), Calciumoxyd (CaO), granuliertes Calciumchlorid ( $CaCl_2$ ), geschmolzenes Calciumchlorid ( $CaCl_2$ ), Zinkchlorid ( $ZnCl_2$ ), Zinkbromid ( $ZnBr_2$ ), wasserfreies Kupfersulfat ( $CuSO_4$ ).

Die am häufigsten gebrauchten Trockenmittel sind Phosphorpentoxyd, Schwefelsäure und granuliertes Calciumchlorid.

1. Die Wasseraufnahme des Phosphorpentoxyds erfolgt unter Bildung von Orthophosphorsäure.

Das käufliche Phosphorpentoxyd enthält immer kleine Mengen Phosphortrioxyd. Durch Oxydation in einem ozonisierten Luftstrom unter Erwärmung läßt sich nach J. J. MANLEY<sup>2</sup> die stärkste Wirksamkeit erzielen.

Um wegen der starken hygroskopischen Eigenschaft des Phosphorpentoxydpulvers die Schwierigkeit beim Füllen enger Gefäße zu vermeiden, schlägt G. OWEN<sup>3</sup> einen einfachen Füllmechanismus vor. Ein einseitig offenes Glasrohr, in dem durch das obere, zu

<sup>1</sup> J. H. YOЕ: Chem. News 1925, 130, 340; C. 1925, II, 518.

<sup>2</sup> J. J. MANLEY: Journ. Chem. Soc. London 1922, 121, 331; C. 1922, I, 1270.

<sup>3</sup> G. OWEN: Journ. Soc. chem. Ind. 1932, 51, 609; C. 1932, II, 1806.

einem engen Führungsrohr gestaltete Ende des Rohres ein Glasstempel bewegt wird, wird durch Eintauchen in Phosphorpentoxyd gefüllt und dann, nachdem man es außen gereinigt hat, in das Verwendungsgefäß ausgestoßen.

2. Die vielgebrauchte konzentrierte Schwefelsäure ist wegen ihrer flüssigen Beschaffenheit nicht ganz ungefährlich. Diese Gefahr läßt sich aber umgehen durch Einsetzen von Glasgittern, Glasscherben, Beimengungen von Asbest und Bimssteinstücken, wobei bei Anwendung von Asbest und Bimsstein die wirksame Oberfläche der Säure noch vergrößert wird. Die Verwässerung der Schwefelsäure soll nur bis zur Bildung einer 85%igen Säure gehen, da bei dieser die Wirksamkeit wesentlich nachläßt.

Um die Verwässerung der Schwefelsäure zu erkennen, dient nach G. BOEHM<sup>1</sup> eine Zugabe von 1% Bariumsulfat (puriss.) zu der konzentrierten Säure. Zunächst bildet sich das lösliche Bisulfat, bei weiterer Wasseraufnahme erscheinen nadelförmige Krystalle von der Zusammensetzung:  $\text{BaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , bis schließlich ein pulverförmiger Bodensatz von Bariumsulfat auftritt, der den erreichten Grad der Verwässerung anzeigt.

3. Calciumchlorid wird seiner Billigkeit wegen benutzt; der Wirkungsgrad ist jedoch nicht sehr groß. In Verbindung mit Calciumoxyd und Silikaten kommt es in Formen gepreßt unter den Namen „Nozonstein“ in den Handel<sup>2</sup>. Das aufgenommene Wasser kann durch Trocknen wieder entfernt werden.

4. Das in neuerer Zeit, besonders in den Vereinigten Staaten von Amerika, eingeführte Magnesiumperchlorat soll ebenso wirksam sein wie Phosphorpentoxyd.

Die Herstellung geschieht folgendermaßen: Das Hexahydrat ( $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) wird in einem durch Phosphorpentoxyd getrockneten Luftstrom auf 250° erhitzt. Hierbei bildet es eine feste, weiße, leicht zu pulverisierende, wasserfreie Masse ( $\text{Mg}[\text{ClO}_4]_2$ ).

Auch das Trihydrat zeigt gute trocknende Eigenschaften, die jedoch bei 0° größer sind als bei höheren Temperaturen.

Magnesiumperchlorat kann durch Erhitzen auf 140° im Vakuum regeneriert werden. Es wird entweder für sich allein oder mit Bariumperchlorat vermischt, zur Trocknung gebraucht.

5. Bariumoxyd zeigt auch bei 100° noch große Trockenkraft, kann allerdings nicht regeneriert werden und muß in verschlossenen Gefäßen aufbewahrt werden, da es kohlen säureempfindlich ist.

6. Aluminiumoxyd soll anderen Trockenmitteln überlegen sein; es ist besser zu handhaben als Phosphorpentoxyd, besitzt nicht die Gefährlichkeit der konzentrierten Schwefelsäure und greift nicht wie diese Gummi an, ist nicht leicht zerfließlich, absorbiert nicht wie Calciumchlorid Kohlen säure, kann in 6—8 Stunden bei 175° reaktiviert werden und nimmt 15—20% seines Gewichtes an Wasser auf<sup>3</sup>.

7. Weniger wirksam als Phosphorpentoxyd und Magnesiumperchlorat, besser als Schwefelsäure und Calciumchlorid soll Borsäureanhydrid wirken. Es nimmt bis zu 28% seines Gewichtes an Wasser auf und geht dabei in die Metaborsäure über. Die wirksame Trocknung beginnt allerdings erst nach einer gewissen Wasseraufnahme.

8. Bei Kieselsäure in Gelform beträgt die Wasseraufnahme bis zu 23% ihres Eigengewichts. Sie hat vor den anderen Trockenmitteln bei der Trocknung der Luft von Analysenwaagen Vorteile<sup>4</sup>.

β) Exsiccatoren. Die einfachsten Exsiccatoren bestehen aus einer Spiegelglasscheibe und einer Glasglocke, die, nötigenfalls mit Hahn und Manometer versehen, einen geschliffenen Rand besitzt. Ein Porzellangefäß nimmt das

<sup>1</sup> G. BOEHM: Chem.-Ztg. 1929, 53, 323.

<sup>2</sup> N. SCHOORL: Pharm. Weekbl. 1928, 65, 836; C. 1928, II, 1694.

<sup>3</sup> J. B. BARNITT u. a.: Ind. Engin. chem. Analyt. Edition 1930, 2, 335.

<sup>4</sup> E. LÖWENSTEIN: Chem.-Ztg. 1932, 56, 127.

Trockenmittel, in den meisten Fällen Schwefelsäure auf und trägt einen Einsatz zum Abstellen der zu trocknenden Substanzen (Abb. 8a).

Transportable Exsiccatoren sind von FRESSENTUS für kleine Substanzmengen (Abb. 8b), von SCHEIBLER (Abb. 8c), FRÜHLING und SCHULZ (Abb. 8d) und vielen anderen angegeben. Der gebräuchlichste Exsiccator ist der von SCHEIBLER,

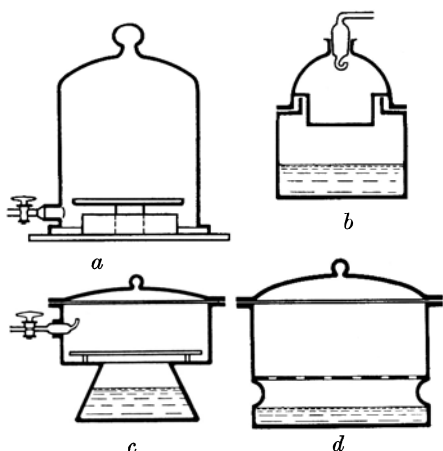


Abb. 8. Exsiccatoren.

der allerdings nicht unerhebliche Nachteile besitzt. Das Trockenmittel befindet sich in dem unteren, konisch ausgeführten Raum, verfügt daher nur über eine kleine wirksame Oberfläche. Weiterhin ist die Anordnung des Trockenmittels unterhalb der zu trocknenden Substanz nachteilig, da feuchte Luft leichter ist als trockene.

HEMPEL<sup>1</sup>, KAEHLER<sup>2</sup> und COCHIUS<sup>3</sup> haben daher das Trockenmittel oberhalb der Substanz angebracht. Diese Exsiccatoren haben sich aber nicht eingebürgert.

Ein von G. MÜLLER<sup>4</sup> angegebener Exsiccator vergrößert die wirksame Oberfläche der Schwefelsäure durch Einsetzen einer porösen Tonzelle; die abtropfende Schwefelsäure sammelt sich in einer Rinne.

Alle Exsiccatoren werden zum Schutz gegen Licht auch in braunem Glase hergestellt.

Die zu trocknenden Substanzen stehen auf Einsätzen verschiedener Art, meist auf Porzellanplatten mit Löchern.

Da beim Einsetzen heißer Gegenstände in den Exsiccator durch die sich ausdehnende Luft der Deckel hochspringen und abgleiten kann, hat man nicht nur den Deckel mit einem Ring versehen, der im Innern des Exsiccators angreift, sondern hat auch Aufsätze konstruiert, die die sich ausdehnende Luft entweichen lassen und auch den Wiedereintritt trockener Luft gestatten (Abb. 9).

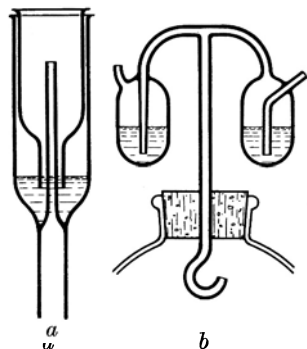


Abb. 9. Aufsätze für Exsiccatoren. a nach STRITAR, b nach REITMAIR.

Vakuum-Exsiccatoren. Lediglich durch Trockenmittel in Exsiccatoren bei Zimmertemperatur ist es meist nicht möglich, die auf ihren Wassergehalt zu untersuchende Substanz vollkommen zu trocknen. Man muß daher in der Regel unter vermindertem Druck arbeiten und zumeist auch schwach erwärmen.

Zur Erzeugung eines Vakuums dient in der Regel die Wasserstrahlpumpe. Eine äußerst einfache Methode, recht hohe Vakua zu erzeugen, ist die Äther-Schwefelsäure-Methode von BENEDICT und MANNING<sup>5</sup>. Auf die in einem Vakuumexsiccator befindliche Schwefelsäure stellt man eine mit Äther gefüllte PETRI-Schale. Nachdem man mittels der Wasserstrahlpumpe evakuiert hat, schließt man den Hahn des Exsiccators. Allmählich fällt der Druck im Innern auf 1 mm. Nach mehrtägigem Stehen tritt geringe Tendenz zur Bildung von Säuredämpfen auf.

<sup>1</sup> HEMPEL: Zeitschr. angew. Chem. 1891, 200.

<sup>2</sup> KAEHLER: Chem.-Ztg. 1896, 20, 274.

<sup>3</sup> COCHIUS: Chem.-Ztg. 1900, 24, 266.

<sup>4</sup> G. MÜLLER: Chem.-Ztg. 1898, 22, 450.

<sup>5</sup> BENEDICT u. MANNING: Amer. Chem. Journ. 1902, 27, 340; C. 1902, I, 391.

Um in einem evakuierten Exsiccator beim Eintritt von Luft ein Verstäuben pulveriger Substanzen zu vermeiden, hat man den Lufteintritt durch geeignete Vorrichtungen reguliert. Die Apparate der Abb. 10 sind ohne weiteres verständlich.

Die elektrische Beheizung von Exsiccatoren erfolgt durch Heizplatten, die entweder in den Exsiccator einmontiert sind oder auf denen die Exsiccatorglocke ruht. Einen Exsiccator, der zum Trocknen sowohl bei gewöhnlicher Temperatur als auch mit gleichzeitiger Erwärmung auf etwas höhere als Zimmertemperatur ohne oder mit Evakuierung verwendet werden kann, stellt Abb. 11 dar.

Im unteren Teil des Exsiccators befindet sich entweder konzentrierte Schwefelsäure oder eine Glasschale *P* mit Phosphorpentoxyd und auf der Verengung des Exsiccators eine durchlöchernte Messingplatte *W*, auf der die elektrische Heizplatte ruht. Hierüber befindet sich eine weitere Metallplatte, an der ein Thermometer *T* und ein Manometer *M* befestigt sind. Die Drähte *S*

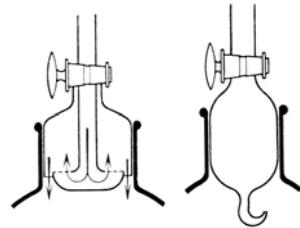


Abb. 10. Aufsätze für Exsiccatoren nach WIESE.

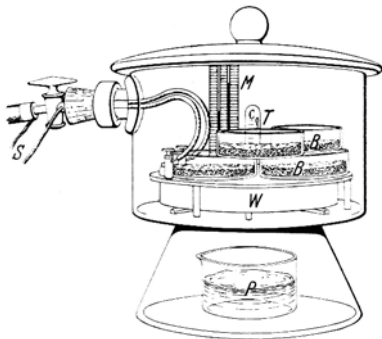


Abb. 11. Vakuüm-Exsiccator mit elektrischer Heizung.

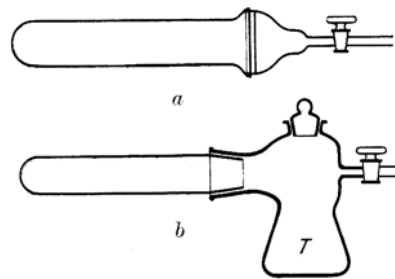


Abb. 12. Trockenröhren.

für die Zuführung des elektrischen Stromes gehen durch den Gummistopfen des Tubus, durch den auch das Hahnrohr zur Saugpumpe führt.

γ) **Trockenröhren.** Gelegentlich werden statt der Exsiccatoren auch Trockenröhren verwendet. Die einfachste Form dieser Apparate ist die Trockenröhre nach **ABDERHALDEN** (Abb. 12*a*), eine andere Form die Trockenröhre nach **MEYER** (Abb. 12*b*), bei der sich das Trockenmittel in dem Raume *T* befindet. **A. OPPÉ**<sup>1</sup> gibt eine Trockenröhre (Abb. 13) an, die wägbar und vakuumfest ist. Sie kann für die Trocknung voluminöser, hygroskopischer Stoffe, z. B. Fasern, dienen. Ein trockener Gasstrom kann die Röhre durchfließen und die Trocknung befördern.

### 3. Trocknungsverfahren.

Bei der Ausführung der Wasserbestimmung durch den Trocknungsverlust trocknet man — soweit nicht bei gewissen Lebensmitteln besondere Vorschriften bestehen oder Verfahren vereinbart sind oder bei der Natur der Substanz abweichende Verfahren in Frage kommen — bei 100—110°, in der Regel bei 105°, zunächst etwa 2 Stunden lang, stellt dann den Gewichtsverlust fest und wiederholt darauf das Trocknen mehrmals je eine Stunde lang, bis die Gewichtsabnahme

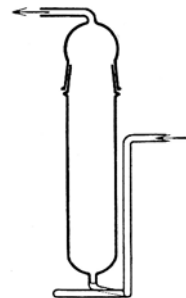


Abb. 13. Trockenröhre nach A. OPPÉ.

<sup>1</sup> A. OPPÉ: Chem. Fabrik 1928, 241.

nach zwei aufeinanderfolgenden Wägungen sich nicht mehr geändert hat bzw. nur noch eine gleichmäßig geringe Gewichtsabnahme erfolgt ist (S. 540).

Für die verschiedenen Lebensmittel gestaltet sich im übrigen die Ausführungsart der Wasserbestimmung verschieden:

a) Feste Stoffe, die in gemahlenem, zerriebenem oder gepulvertem Zustande vorliegen, werden in geeigneten Trockengläschen mit eingeschliffenen Deckel derart eingewogen, daß die Substanz mit der Außenluft möglichst wenig in Berührung bleibt. Die Menge der Einwaage beläuft sich je nach dem Wassergehalt auf etwa 2—5 g Substanz. Während des Trocknens wird der Deckel quer über das jetzt geöffnete Gefäß gelegt. Nach dem Trocknen läßt man die geschlossenen Gläschen im Exsiccator erkalten und lüftet nur kurz vor dem Wägen den Deckel, um einen Ausgleich des inneren, geringeren Druckes mit dem Außendruck herbeizuführen.

b) Für Flüssigkeiten, wie Milch, Wein<sup>1</sup>, Bier, ebenso für Sirupe und Extrakte und ferner auch für Butter und Fette aller Art, bedient man sich zweckmäßig flacher, mit Deckel versehener Nickel- oder Glasschalen von etwa 50—90 mm Durchmesser und 10—30 mm Höhe. Flüssigkeiten werden hierbei erst auf dem Wasserbade oder im Dampftrockenschrank eingetrocknet und dann erst in den Trockenschrank von 100—110° gebracht. Von Flüssigkeiten und Sirupen verwendet man, falls keine besonderen Vorschriften für den zu untersuchenden Gegenstand gegeben sind, so viel, daß der Trockenrückstand nicht mehr als 1—2 g beträgt.

Dextrin- und zuckerreiche Stoffe, wie Sirupe, ferner protein- bzw. stickstoffreiche Extrakte oder Flüssigkeiten geben nur sehr langsam ihr Wasser beim Trocknen ab. Um bei diesen Stoffen die Austrocknung zu unterstützen, pflegt man eine bestimmte Menge in einer Platin- oder Glasschale<sup>2</sup> auf geglühtem Quarzsand oder grobem Bimssteinpulver abzuwägen, sie darauf mit etwas Wasser zu versetzen und in dem Sande bzw. dem Bimssteinpulver mittels eines mittarierten dünnen Glasstabes zu verteilen<sup>3</sup>.

Statt die Substanz abzuwägen, kann man auch einen aliquoten Teil, etwa 25 oder 50 ccm, der Lösung mit einer bestimmten Gewichtsmenge des Stoffes nehmen, läßt diese in den in einer Schale befindlichen Quarzsand fließen, dampft erst im Wasserbade unter zeitweiligem Rühren zur Trockne und trocknet dann im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz. Durch die hierbei ermöglichte bessere Verteilung der Substanz geht die Austrocknung wesentlich schneller vor sich.

Für Extrakte gibt O. ANSELMINO<sup>4</sup> ein Verfahren an, das eine möglichst große Oberfläche der Substanz erzielen soll: Zwei runde, 2,5 mm dicke Glasplättchen von 7 cm Durchmesser besitzen je eine matte und eine blanke Oberfläche. Auf der blanken Fläche ist je ein Ring aufgeklebt, der zur Handhabe dient. Nachdem die Platten gewogen sind, wird eine bestimmte Menge — 1,5 g — Substanz auf die eine matte Fläche gebracht und durch Gegeneinanderreiben der Plättchen eine sehr dünne, gleichmäßige Schicht erzeugt. Alsdann zieht man die Platten rasch seitlich voneinander ab und trocknet sie im Trockenschrank.

Zur Erzielung einer großen Oberfläche läßt J. BONG<sup>5</sup> Flüssigkeiten, z. B. Blut von getrocknetem Filtrierpapier aufsaugen. Ähnlich verfahren E. R. BOLTON und C. REVIS<sup>6</sup> mit sog. „sauren Ölen“.

<sup>1</sup> Bei manchen klaren Flüssigkeiten (Zuckerlösungen, Sirupen, alkoholischen Getränken usw.) kann man den Wasser- bzw. Trockensubstanz- (Extrakt-)Gehalt auch aus dem Spezifischen Gewicht oder der Lichtbrechung berechnen. Näheres hierüber ist bei den einzelnen Lebensmitteln angegeben.

<sup>2</sup> O. LÜNING (Chem.-Ztg. 1921, 45, 831) schlägt vor, hierfür 6 cm hohe Nickelbecher zu verwenden.

<sup>3</sup> Bei zuckerreichen Substanzen kann die Verteilung auch während des Trocknens noch in der Wärme wiederholt werden.

<sup>4</sup> O. ANSELMINO: Apoth.-Ztg. 1913, 28, 825; C. 1913, II, 1785.

<sup>5</sup> L. BRACALONI: Farmac. Sperim. 1923, 46, 115.

<sup>6</sup> E. R. BOLTON u. C. REVIS: Analyst 1918, 43, 158; C. 1919, II, 945.

Zur Beschleunigung der Trocknung empfiehlt sich in manchen Fällen ein Zusatz von Alkohol, besonders dann, wenn sich das Wasser wegen capillarer Bindung schwer entfernen läßt. Die Wirkung des Alkohols beruht darauf, daß er die Oberflächenkräfte weitgehend aufhebt. Alkohol nimmt das Wasser begierig auf und führt es beim Abdampfen leichter mit sich fort, als wenn Wasser allein verdampft. So beschreibt A. LOWENSTEIN<sup>1</sup> ein Verfahren für Stoffe dickflüssiger oder halbfester Konsistenz, wie Fleischextrakt, Sirup, Käse, Melasse usw. In eine gewogene Metallschale mit Glasrührer wird eine bestimmte Menge Substanz eingewogen, mehrmals mit 15 ccm Alkohol vermischt und auf dem Wasserbade unter Umrühren verdampft. Meist genügt ein zweimaliges Vermengen mit 95%igem Alkohol. Man läßt dann noch eine halbe Stunde auf dem Wasserbade stehen und trocknet schließlich bei 105° bis zur Gewichtskonstanz.

Wenn die letzten Reste Wasser-Alkohol im luftverdünnten Raum entfernt werden, so nimmt die Masse häufig eine schaumartige Beschaffenheit an; infolgedessen kann sie durch einen Luftstrom leichter austrocknet werden. ZULKOWSKI und PODA<sup>2</sup> haben für diesen Zweck Methylalkohol

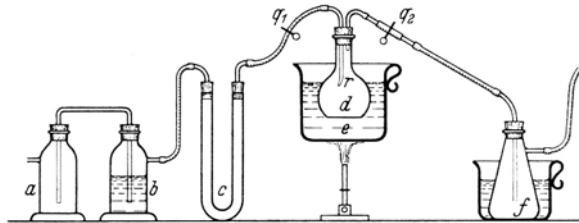


Abb. 14. Wasserbestimmung nach ZULKOWSKI und PODA.

und einen besonderen Apparat vorgeschlagen (Abb. 14), der sich für die Bestimmung des Wassers in Sirupen, Melasse, Füllmasse, Invertzucker, Malz-, Bier- und Milchextrakt sowie Seife vorzüglich bewährt haben soll.

In das 250—300 ccm fassende Kölbchen *d* werden 10 g Sirup usw. eingewogen, 50 ccm Methylalkohol zugesetzt und das Kölbchen mit den übrigen Teilen des Apparates verbunden. Das Zuleitungsrohrchen *r* wird emporgehoben und der Schraubenschnellhahn *q*<sub>1</sub> geschlossen. Der Kolben *d* wird in ein Wasserbad *e* getaucht, das so weit erhitzt wird, daß die Flüssigkeit im Kolben gelinde siedet. Ist sie abdestilliert, so wiederholt man dasselbe mit Zusatz von 25 ccm Methylalkohol. Hierauf wird durch eine an *f* angelegte Wasserstrahlpumpe ein Vakuum von 65 mm erzeugt, wodurch der dick gewordene Rückstand schaumartig emporsteigt. Ist der Schaum starr geworden und zeigen sich keine Dampfblasen mehr, so wird das Röhrchen *r* herabgesenkt, *q*<sub>1</sub> ein wenig geöffnet und bei 65 mm Druck  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  Stunde getrocknete Luft zur Verdrängung des Alkoholdampfes durchgeleitet. Dann wird der Schraubenschnellhahn *q*<sub>2</sub> geschlossen, die Wasserstrahlpumpe abgestellt, das Wasserbad entfernt und das Kölbchen nach dem Erkalten und Verschließen gewogen. Die Bestimmung dauert 2—2 $\frac{1}{2}$  Stunden. Selbstverständlich muß die Verbindung des Kölbchens mit der Trockenvorrichtung *a*, *b*, *c* vollkommen dicht sein.

c) Bei wasserreichen, ungleichmäßig zusammengesetzten Stoffen, die sich nicht so weit zerkleinern lassen, daß kleine Gewichtsmengen von einigen Gramm einen genügenden Durchschnitt darstellen, ist eine Vortrocknung, zunächst bei 50—60°, alsdann eine Zerkleinerung und weiter eine völlige Austrocknung bei 100—110° erforderlich. Zu solchen Stoffen gehören z. B. Fleisch, Eier, Kartoffeln, Rüben, Gemüse, Tabak u. a. Zwar lassen sich bei manchen dieser Lebensmittel durch Verreiben, Zerschneiden und besondere Reibvorrichtungen gleichartig beschaffene Breie herstellen, die für einzelne Bestimmungen, zu denen größere Gewichtsmengen von 20—50 g und mehr verwendet werden können, ausreichen, aber solche Lebensmittel lassen sich nicht ohne Wasserverlust und unzersetzt aufbewahren, wenn eine eingehende Untersuchung auf mehrere oder alle Bestandteile, deren Bestimmungen nicht gleichzeitig in Angriff

<sup>1</sup> A. LOWENSTEIN: Journ. Ind. Engin. Chem. 1909, 1, 252; C. 1909, II, 1692.

<sup>2</sup> ZULKOWSKI u. PODA: Ber. Österr. Ges. z. Förderung d. Chem. Industrie 1894, 16, 92; C. 1894, II, 532.



genommen werden können, längere Zeit dauert. Aus diesem Grunde müssen solche Stoffe durch Vortrocknen in den lufttrockenen Zustand überführt werden.

Die Herstellung von derartigen lufttrockenen Proben ist je nach der Art der Lebensmittel verschieden. Fleisch (1 kg und mehr) wird vor dem Vortrocknen entweder mit dem Messer oder in der Fleischhackmaschine zerschnitten, hiervon eine bestimmte Menge abgewogen und in eine flache, emaillierte, vorher gewogene Schale gebracht; in einer solchen lassen sich auch Käse sowie Eier, die man vorher durcheinander verrührt und gewogen hat, zweckmäßig vortrocknen. Rüben und Kartoffeln (0,5—1,0 kg) zerschneidet man entweder ganz oder, um einen besseren Durchschnitt zu erhalten, je  $\frac{1}{2}$  oder  $\frac{1}{4}$  mehrerer Rüben bzw. Knollen in Scheiben; oder man verwendet von jedem Viertel nur zwei Scheiben von beiden Seiten, reiht die Scheiben an einen vorher gewogenen Messingdraht mit Bügel und hängt diese in einen Trockenschrank von 50—60°. Die Scheiben kleiner Kartoffeln und Rüben können auch in emaillierten, flachen Eisenschalen abgewogen und vorgetrocknet werden, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß der Inhalt der Schalen während des Vortrocknens mit einem Glasstab oder -spatel wiederholt umgerührt werden muß. Gemüse und ähnliche sperrige Stoffe werden mit einem scharfen Messer oder einer Schere fein zerschnitten, von der zerschnittenen Masse wird nach dem Durcheinandermengen eine Menge von etwa 1 kg abgewogen und in Schalen oder auf Hürden mit Papierunterlage in den Trockenschrank gebracht, vorausgesetzt, daß aus ihnen während des Vortrocknens kein Saft ausläuft. Dieses ist aber bei niedrigeren Temperaturen bis 50° oder 60° für diese Stoffe und auch für Rüben und Kartoffeln nicht zu befürchten. Eher tritt in den flachen Schalen bei fetthaltigen bzw. -reichen Stoffen, z. B. Fleisch, Fett oder Saft aus. Das Fleisch wird daher von äußerlich anhaftendem Fett befreit, sein Verhältnis zum Fleisch festgestellt und entweder für sich untersucht oder nach dem Vortrocknen und Zerkleinern des Fleisches mit diesem wieder aufs innigste vermischt. Auch der etwa ausgetretene und trockene Saft muß selbstverständlich während der Trocknung wieder innigst mit der Masse vermischt werden.

Die einige Tage bei 50—60° getrockneten Substanzen läßt man einen halben Tag an der Luft liegen, bis sie wieder die normale Menge Luftfeuchtigkeit aufgenommen haben, also „lufttrocken“ geworden sind. Alsdann wägt man zurück, zermahlt sie je nach ihrer Beschaffenheit mit der Schrotmühle oder zerkleinert sie (bei fettreichen Substanzen) im Mörser oder mit der Fleischhackmaschine. Die fein zerkleinerte Masse dient dann in der vorher beschriebenen Weise zur Wasserbestimmung bei 100—110°.

Die Art der Berechnung des Wassergehaltes geschieht hierbei in folgender Weise: Beträgt der Trockenverlust bei der Vortrocknung bei 50—60°  $p_1\%$  und der bei der zweiten Trocknung bei 100—110°  $p_2\%$ , dann ist der Wassergehalt:

$$W = p_1 + p_2 - \frac{p_1 \cdot p_2}{100} \%.$$

d) Bei kolloidalen Substanzen, wie Leim, Gelatine usw., benutzt man nicht die zerkleinerte, lufttrockene Substanz, sondern wendet die „Sol Trocknung“ an. Man stellt sich aus einer gewissen Menge Leim und der  $2\frac{1}{2}$ -fachen Menge Wasser ein Sol her, nimmt von der wieder abgekühlten, gewogenen Menge ein aliquoten Teil, dessen Prozentgehalt an Leim man berechnen kann, und trocknet diese Menge entweder auf Sand<sup>1</sup> oder in Aluminiumbechern, in denen man unter Umschwenken des erwärmten Soles einen dünnen Film an der Wandung des Bechers erzeugt, der dann im Trockenschrank getrocknet wird<sup>2</sup>.

Mitunter ist das Wägen offener Trockengefäße nicht zu umgehen. Besteht hier die Gefahr der Wasseraufnahme während der Wägung, so bedient man sich der Extrapolationsmethode, die zwar keine genaue mathematische Erfassung<sup>3</sup>, aber immerhin eine große Annäherung ergibt. Es wird ausgegangen von der Proportionalität zwischen der Geschwindigkeit der Aufnahme von Feuchtigkeit und der Substanzmenge<sup>4</sup>. Man wägt nach Zeit und extrapoliert dann auf die Zeit Null.

<sup>1</sup> G. GÜNTHER: Kunstdünger- u. Leim.-Ind. 1929, 26, 159; C. 1929, II, 3203.

<sup>2</sup> O. GERNGROSS: Kunstdünger- u. Leim.-Ind. 1929, 26, 195; C. 1929, II, 1758.

<sup>3</sup> J. REHNER jr.: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 88, 266.

<sup>4</sup> Richtiger wäre es wohl, statt der Substanzmenge die der Luft ausgesetzte Substanzoberfläche in Beziehung zu setzen.

## B. Wasserbestimmung durch Absorption.

Das Verfahren, bei dem das Wasser durch Erwärmung der Substanz im Strome trockener Luft oder inerte Gase ausgetrieben und in gewogenen Absorptionsgefäßen aufgefangen und zur Wägung gebracht wird, ist das älteste Verfahren einer direkten Wasserbestimmung; es wird angewandt namentlich bei solchen Substanzen, bei denen beim Erwärmen außer dem Wasser auch Kohlen- säure (z. B. aus Bicarbonaten) oder Sauerstoff (aus sauerstoffreichen Ver- bindungen) entweicht.

Es ist natürlich auch anwendbar bei allen Substanzen, bei denen das Wasser durch Trocknungsverlust (S. 539) bestimmbar ist, wird aber bei solchen wegen seiner Umständ- lichkeit in der Regel nicht angewendet. Dagegen ist es nicht anwendbar bei Substanzen, die beim Erwärmen neben Wasser auch andere flüchtige Stoffe, wie Ammoniak, Schweflige Säure, Schwefelwasserstoff, äthe- rische Öle usw. abgeben, die von den wasserabsorbierenden Mitteln ebenfalls absorbiert werden.

Die Ausführung des Ver- fahrens geschieht folgender- maßen:

Der Trockenkasten *T* (Abb. 15) ist von 4 Rohren durchsetzt, in welche die an einer Seite ausgezogenen Glasrohre (*r*) — etwa von der Form der Asbestfilterröhrchen für Zuckerbestimmungen — hinein- passen. In diese gibt man die ab- gewogene Substanz (2—5 g), ver- bindet das weitere Ende mit der Trockenvorrichtung für die eintretende Luft, bestehend aus der Waschflasche *a* mit konzen- triertem Schwefelsäure und dem Chlorcalciumrohr *b*, und das ausgezogene Ende mit den Chlorcalciumrohren *c* und *d*, von denen *c* gewogen ist, während *d* nur zum Schutze des Rohres *c* vor dem Wasserdampf des Aspirators dient. Darauf erwärmt man den Trocken- kasten *T* auf 105—110° und saugt mittels eines Aspirators durch den Apparat einen lang- samen Luftstrom, der dann seinen Wassergehalt an das Chlorcalciumrohr *c* abgibt.

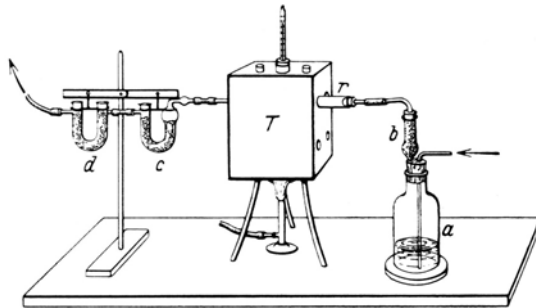


Abb. 15. Apparat zur direkten Wasserbestimmung nach J. KÖNIG.

Die Bestimmung erfolgt durch Destillation des Wassers mit Hilfe von mit Wasser praktisch nicht mischbaren Flüssigkeiten, Kondensation des Wasserdampfes und Messung des überdestillierten Wassers in graduierten Meßröhrchen.

## C. Wasserbestimmung durch Destillation.

Die Bestimmung erfolgt durch Destillation des Wassers mit Hilfe von mit Wasser praktisch nicht mischbaren Flüssigkeiten, Kondensation des Wasserdampfes und Messung des überdestillierten Wassers in graduierten Meßröhrchen.

### 1. Siedeflüssigkeiten.

Als Siedeflüssigkeiten kommen in Betracht:

a) Spezifisch leichter als Wasser.

1. Petroleum, farblos, durch fraktionierte Destillation von den über 170° siedenden Bestandteilen befreit, neben Kohlenwasserstoffen keine flüchtigen Stoffe enthaltend (C. MAI und E. RHEINBERGER<sup>1</sup>, A. A. BESSON<sup>2</sup>, E. W. DEAN und D. D. STARK<sup>3</sup>).

2. Terpentinöl, Dichte 0,86; Siedepunkt 156° (G. TESTONI<sup>4</sup>, E. PAROW und E. ELLRODT<sup>5</sup>, U. FABRIS<sup>6</sup>).

3. Schmieröl (J. F. HOFFMANN<sup>7</sup>, BROWN-DUVAL).

4. Benzin, Siedepunkt 95—120°.

<sup>1</sup> C. MAI u. E. RHEINBERGER: *Z.* 1912, 24, 125.

<sup>2</sup> A. A. BESSON: *Chem.-Ztg.* 1917, 41, 346.

<sup>3</sup> E. W. DEAN u. D. D. STARK: *Journ. Ind. Engin. Chem.* 1925, 17, 147.

<sup>4</sup> G. TESTONI: *Staz. sperim. agrar. ital.* 1904, 37, 366; *C.* 1904, II, 562.

<sup>5</sup> E. PAROW u. E. ELLRODT: *Zeitschr. Spiritusind.* 1905, 28, 80.

<sup>6</sup> U. FABRIS: *Z.* 1931, 61, 354.

<sup>7</sup> J. F. HOFFMANN: *Wochenschr. Brauerei* 1902, 19, 301; *C.* 1902, II, 152.

5. Benzol, Dichte 0,879, Siedepunkt 80° (S. S. SADTLER<sup>1</sup>).
6. Toluol, Dichte 0,867, Siedepunkt 111° (G. L. BIDWELL und W. F. STERLING<sup>2</sup>).
7. Xylol, Dichte 0,862, Siedepunkt 140° (MARCUSON<sup>3</sup>).
8. Amylalkohol, Dichte 0,815, Siedepunkt 138° (KUBIERSCHKY<sup>4</sup>).

b) Spezifisch schwerer als Wasser.

1. Tetrachloräthan (CHCl<sub>2</sub> · CHCl<sub>2</sub>), Dichte 1,592, Siedepunkt 146° (J. TAUSS und H. RUMM<sup>5</sup>, E. SCHLUMBERGER<sup>6</sup>, A. VAN DER WERTH<sup>7</sup>, J. PRITZKER und R. JUNGKUNZ<sup>8</sup>).
2. Perchloräthylen (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>), Dichte 1,620, Siedepunkt 121°.
3. Trichloräthylen (CHCl:CCl<sub>2</sub>), Dichte 1,470, Siedepunkt 87°.
4. Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>), Dichte 1,594, Siedepunkt 77°.

## 2. Allgemeines zur Methodik.

Fehler können bei den Destillationsverfahren entstehen durch eine ungenaue Einteilung des gradierten Teiles des Meßrohres und durch fehlerhaftes Ablesen des Meniscus, der durch die über dem Wasser befindliche organische Flüssigkeit abgeflacht wird. Letzterer Fehler kann aber durch einen Blindversuch ein für allemal ermittelt werden.

Bei Verwendung von Benzol empfiehlt F. C. FUCHS<sup>9</sup> für die leichtere Meniscusablesung den Gebrauch eines nur in Benzol löslichen Farbstoffes, wie 1—2 ccm einer konzentrierten Lösung von natürlichem Asphalt in Benzol.

Eine Schwierigkeit entsteht durch das Haftenbleiben von Wassertropfen an den Wandungen des Meßgefäßes, die sich aber durch eine mit dem Übertreibmittel befeuchtete Federfahne oder durch schwaches Klopfen entfernen lassen. Besser ist die vorherige Füllung des Meßrohres mit der zu verwendenden Flüssigkeit. J. PRITZKER und R. JUNGKUNZ<sup>10</sup> und L. SSELSKI<sup>11</sup> schlagen vor, das abnehmbare Meßgefäß zu zentrifugieren. Auf alle Fälle ist aber für eine gute Reinigung der Meßröhre Sorge zu tragen: Behandeln mit strömendem Wasserdampf und Chrom-Schwefelsäure verringern den Fehler schon merklich. Auch im Kühlerrohr können Wassertropfen hängen bleiben, die durch nachträgliches Ausspülen mit dem Destillationsmittel oder durch kräftiges Sieden am Ende des Versuches entfernt werden können.

A. USPENSKI und K. TSCHIBISOW<sup>12</sup> schlagen vor, das überdestillierende Wasser in Glycerin-Phosphorsäure-Lösung zu absorbieren. Die Bürette wird mit dem Übertreibmittel und einer Lösung, die aus 1 Teil Glycerin, 1 Teil Phosphorsäure (Spez. Gew. 1,3) und wenig Methylorange bis zur schwachen Rotfärbung besteht, gefüllt. Aus der Volumenzunahme läßt sich unter Berücksichtigung der Temperatur der Wassergehalt bestimmen.

Bei Anwendung von Xylol treten häufig Siedeverzüge auf, die in schweren Fällen zu einem Platzen des Siedekolbens und anschließend zu Bränden Veranlassung geben können.

Siedeverzüge können durch Siederegler, wie Zinkstaub, Tonscherben, Bimsstein, Glasperlen, trockenen Sand, spiralig gebogenen Aluminiumdraht usw. verhindert werden.

Um die Brandgefahr auszuschließen, sind von verschiedenen Forschern chlorierte niedrigere Kohlenwasserstoffe, wie Tetrachloräthan u. a. vorgeschlagen worden. Hier wie bei der Verwendung von Amylalkohol ist jedoch eine größere Löslichkeit des Wassers

<sup>1</sup> S. S. SADTLER: Journ. Ind. Engin. Chem. 1910, 2, 66; C. 1910, II, 38.

<sup>2</sup> G. L. BIDWELL u. W. F. STERLING: Journ. Ind. Engin. chem. 1925, 17, 147.

<sup>3</sup> MARCUSON: Mitt. Materialprüfungsamt Berlin 1905, 23, 58; C. 1906, I, 289.

<sup>4</sup> H. HIRZ: Braunkohle 1929, 28, 105.

<sup>5</sup> J. TAUSS u. H. RUMM: Zeitschr. angew. Chem. 1926, 39, 155.

<sup>6</sup> E. SCHLUMBERGER: Papierfabrikant 24; Ver. d. Zellst.- u. Papier-Chem. u. Ing. 1926, 24, 783; C. 1927, I, 1084.

<sup>7</sup> A. VAN DER WERTH: Chem.-Ztg. 1928, 52, 23.

<sup>8</sup> J. PRITZKER u. R. JUNGKUNZ: Chem.-Ztg. 1929, 53, 603.

<sup>9</sup> F. C. FUCHS: Engin. Mining Journ. 1918, 106, 357; C. 1919, II, 379.

<sup>10</sup> J. PRITZKER u. R. JUNGKUNZ: Chem.-Ztg. 1926, 50, 962.

<sup>11</sup> L. SSELSKI: Petroleum (russ.) 1927, 13, 623; C. 1928, I, 2762.

<sup>12</sup> A. USPENSKI u. K. TSCHIBISOW: Zeitschr. angew. Chem. 1927, 40, 464.

in Rechnung zu setzen. — Tetrachloräthan greift in feuchtem Zustande Metall an, weshalb die Destillationsapparate zweckmäßig aus Glas hergestellt werden. Es ist gegen Alkalien empfindlich und spaltet unter gewissen Bedingungen Salzsäure ab.

Ein anderer Fehler wird bedingt durch die, wenn auch geringe Löslichkeit des Wassers in den Destillationsflüssigkeiten. Es ist daher von verschiedenen Seiten die Benutzung eines bereits mit Wasser gesättigten Destillationsmittels vorgeschlagen worden, während andere eine Korrektur, die durch einen Blindversuch ermittelt wird, in Betracht ziehen.

P. SCHLÄPFER<sup>1</sup> führt eine Klärung der getrübbten Xylolschicht durch  $\frac{1}{4}$ stündiges Eintauchen des Meßröhrchens in warmes Wasser herbei; nachträgliche Trübung tritt nicht mehr ein.

Weiterhin wird einerseits nicht immer das ganze Wasser erfaßt (Mais), andererseits durch sehr unregelmäßige Abgabe von Hydratwasser oder durch Zersetzung von Zucker in zuckerhaltigen Substanzen<sup>2</sup> zuviel Wasser gefunden.

Die Zersetzung des Zuckers unter Wasserabspaltung ist nach P. BERG und S. SCHMECHEL<sup>3</sup> einer Säurewirkung (bei Verwendung von Tetrachloräthan) zuzuschreiben und an der fortschreitenden Caramelisierung bzw. Verkohlung zu erkennen, wird aber schon durch sehr vorsichtige Destillation und durch Zusatz von Calciumcarbonat zur Ausschaltung der Säurewirkung verhindert.

Ebenso erhöhen mit Wasser mischbare Substanzen, wie Alkohol, Glycerin, Aceton usw., die mit überdestillieren, das Resultat.

Vorzüge des Destillationsverfahrens. Das Destillationsverfahren besitzt gegenüber der Trockenmethode neben der Schnelligkeit der Bestimmung den Vorzug, daß es auch auf Substanzen anwendbar ist, die bei der Temperatur des Trockenschrankes eine Zersetzung bzw. Oxydation erleiden, wie es z. B. bei Sauermilchpulver, Fleischextrakt, Pflanzendrogen usw. der Fall ist.

Um das Aufschäumen mancher Substanzen wie Milch, Butter, Rahm, Seife zu unterbinden, ist ein Zusatz von Gerbstoff bzw. Ölsäure<sup>4</sup> vorgeschlagen worden. Ist die Substanz sirupös, so verreibt man sie nach einem Vorschlage von K. SCHERINGA<sup>5</sup> am besten mit trockenem Sand.

### 3. Ausführung der Bestimmung.

Im allgemeinen wägt man eine bestimmte Menge Substanz, die sich nach dem zu erwartenden Wassergehalt richtet, ab und vermischt sie mit der vorgeschriebenen Menge des Destillationsmittels. Die Erwärmung kann, je nach der Art der Einzelvorschrift langsam oder schnell vor sich gehen. Nach kurzer Dauer — bei spezifisch schweren Übertreibmittel in wesentlich kürzerer Zeit als bei spezifisch leichten Flüssigkeiten — ist der Versuch beendet.

Die Menge des Wassers wird in den meisten Fällen abgelesen, sie kann aber auch auf andere Weise ermittelt werden.

So treibt C. M. CARSON<sup>6</sup> das Wasser aus dem Destillat auf dem Wasserbade mittels eines Stickstoffstromes in gewogene Chlorcalciumröhren über, W. FRANKE<sup>7</sup> bringt das Wasser mit Calciumcarbid in der bekannten Weise (S. 557) in Reaktion.

<sup>1</sup> P. SCHLÄPFER: Zeitschr. angew. Chem. 1914, 27, 52.

<sup>2</sup> W. THÖRNER: Zeitschr. angew. Chem. 1908, 21, 148.

<sup>3</sup> P. BERG u. S. SCHMECHEL: Z. 1931, 62, 575.

<sup>4</sup> J. DAVIDSOHN: Chem.-Ztg. 1930, 54, 934. — E. SCHLENKER: Seifensieder-Ztg. 1931, 58, 96. — R. HART: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1918, 10, 598; C. 1919, II, 189.

<sup>5</sup> K. SCHERINGA: Pharm. Weekbl. 1920, 57, 398; C. 1920, IV, 93.

<sup>6</sup> C. M. CARSON: Ind. Engin. Chem. Analyt. Edition 1929, 1, 225.

<sup>7</sup> W. FRANKE: Braunkohlenarchiv 1932, Nr. 36, 39.

Die ersten Apparaturen für die Destillationsmethode haben HOFFMANN und MARCUSSON angegeben. Beide Verfahren haben im Laufe der Jahre viele

Verbesserungen erfahren. Während früher und zum Teil noch heute Apparate in Betrieb waren bzw. sind, die ohne Rückfluß des Destillationsmittels in den Siedekolben arbeiten, bevorzugt man heute das Rückflußverfahren.

E. W. DEAN und D. D. STARK<sup>1</sup> geben einen Apparat an, wie ihn Abb. 16 zeigt. Das graduierte Rohr verjüngt sich unten, um auch kleine Wassermengen mit genügender Genauigkeit bestimmen zu lassen. Das Meßgefäß ist mit einem Überlauf versehen, der das Destillationsmittel wieder in den Kolben zurückführt. Als Siedekolben kann jeder Rundkolben aus gutem Jenaer Glas, als Kühler jeder LIEBIG-Kühler dienen. Auch der von G. L. BIDWELL und W. F. STERLING<sup>2</sup> angegebene Apparat zeigt eine ähnliche Anordnung.

H. HERBST<sup>3</sup> hat den Kühler mit dem daran angeschmolzenen Auffanggefäß durch einen Schliff mit dem Siedekolben verbunden (Abb. 17).

Apparate, bei denen Kühler und Meßgefäß miteinander verblasen sind und der Siedekolben mittels Schliffes mit dem übrigen Teil verbunden sind, wurden von AUFHÄUSER<sup>4</sup>, R. KATTWINKEL<sup>5</sup>, F. GISIGER<sup>6</sup> sowie S. YOMADA und T. KOSHIDAKA<sup>7</sup> angegeben. Sie haben den Vorzug, daß bei ihnen Korkstopfen vermieden werden, die von den

meisten Destillationsmitteln stark angegriffen werden. Die wesentlich höheren Gesteungskosten verhindern aber eine allgemeine Anwendung.

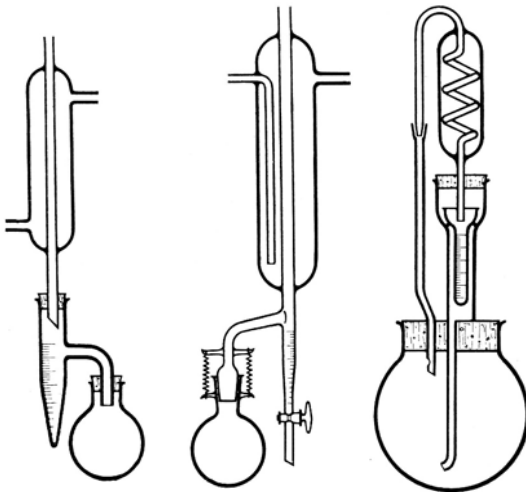


Abb. 16. Nach DEAN und STARK.      Abb. 17. Nach HERBST.      Abb. 18. Nach SCHAEFER.  
Abb. 16–18. Apparate zur Wasserdestillation mit spezifisch leichteren Flüssigkeiten.

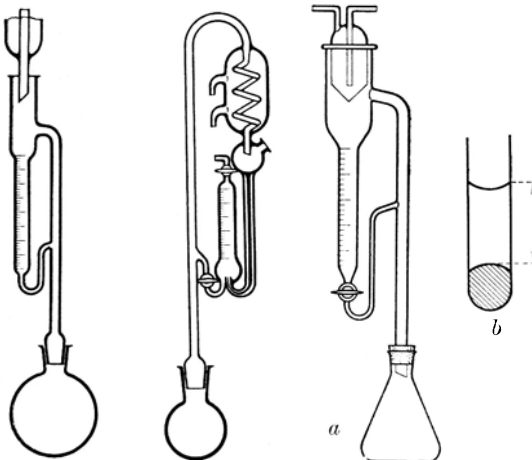


Abb. 19. Nach VANDER WERTH.      Abb. 20. Nach FRIEDRICHS.      Abb. 21. Apparat zur Wasserdestillation mit spezifisch leichteren und schwereren Flüssigkeiten nach PRITZKER und JUNGKUNZ.

<sup>1</sup> E. W. DEAN u. D. D. STARK: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1920, 12, 486; C. 1920, IV, 307.

<sup>2</sup> G. L. BIDWELL u. W. F. STERLING: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1925, 17, 147.

<sup>3</sup> H. HERBST: Chem.-Ztg. 1926, 50, 383. Lieferant Firma H. Fahrenholz in Jena.

<sup>4</sup> AUFHÄUSER: Chem.-Ztg. 1922, 46, 1149.

<sup>5</sup> R. KATTWINKEL: Chem.-Ztg. 1926, 50, 927. — <sup>6</sup> F. GISIGER: Chem.-Ztg. 1927, 51, 688.

<sup>7</sup> S. YOMADA u. T. KOSHIDAKA: Journ. Soc. chem. Ind. Japan 1927, 30, 356; C. 1927, II, 1373.

K. SCHAEFER<sup>1</sup> hat einen Apparat (Abb. 18) angegeben, dessen Auffanggefäß auswechselbar ist. Für jeden zu erwartenden Wassergehalt läßt sich ein passendes Röhrchen wählen, bis zu 10 ccm Wasser mit einer Einteilung in  $\frac{1}{10}$  ccm, bis zu 5 ccm in  $\frac{1}{20}$  ccm und bis zu 2 ccm in  $\frac{1}{50}$  ccm.

Bei Destillationsmitteln, die spezifisch schwerer sind als Wasser, muß das Auffanggefäß, soll die Flüssigkeit während der Destillation dem Siedekolben wieder zugeführt werden, eine andere Gestalt annehmen. A. VAN DER WERTH<sup>2</sup> gibt den in Abb. 19 gezeichneten Apparat an, Abb. 20 zeigt einen solchen von F. FRIEDRICHS<sup>3</sup>. Capillare und Meßgefäß werden vorher mit Tetrachloräthan benetzt bzw. gefüllt, um ein Hängenbleiben von Wassertropfen zu vermeiden.

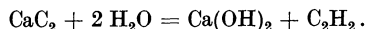
Ein für J. PRITZKER und R. JUNGKUNZ<sup>4</sup> patentierter Apparat (Abb. 21a) erlaubt die Verwendung eines jeden Destillationsmittels. Bei geschlossenem Hahn gestattet er die Verwendung spezifisch leichterer Flüssigkeiten, wie Xylol, Toluol usw., während für spezifisch schwerere Übertreibmittel der Hahn geöffnet wird. Abb. 21b zeigt die Meniscusablesung für den letzteren Fall.

## D. Bestimmung des Wassers durch chemische Umsetzungen.

Die Bestimmung beruht darauf, daß das Wasser mit geeigneten Stoffen in Reaktionen gebracht wird, die sich quantitativ erfassen lassen. In der Hauptsache benutzt man die Entwicklung von Gasen, die beim Zusammentritt von Wasser mit Calciumcarbid, Calciumhydrid usw. entstehen.

### 1. Calciumcarbid-Methode.

Wasser wirkt auf Calciumcarbid ein unter Bildung von Acetylen nach der Gleichung:



Die erste praktische Anwendung dieser Umsetzung zur Wasserbestimmung erfolgte von H. A. DANNE; das Verfahren ist seitdem von einer Reihe von Forschern dauernd verfeinert worden.

#### a) Messung des gebildeten Acetylens.

α) Volumetrisch. Das gebildete Acetylen wird meistens volumetrisch gemessen<sup>5</sup>. Da Acetylen in den meisten Flüssigkeiten löslich ist, ist es schwer, die geeignete Sperrflüssigkeit für das Eudiometer zu finden. Man fängt das Gas am besten über Quecksilber, über konzentrierter Kalilauge oder über mit Acetylen gesättigter Natriumchloridlösung auf. Der Prozentgehalt an Wasser in der Substanz ließe sich mit Hilfe des idealen Gasgesetzes und der AVOGADROschen Formel aus der Umsetzungsleichung errechnen:

$$q = \frac{2 \cdot 100 \cdot 18,016 \cdot 273}{1000 \cdot 22,4 \cdot 760} \cdot \frac{p \cdot v}{T \cdot a} = 0,057783 \cdot \frac{p \cdot v}{T \cdot a},$$

wo  $q$  der gesuchte Wassergehalt in Prozenten,  $v$  das abgelesene Gasvolumen in Kubikzentimeter,  $p$  der herrschende Druck in Millimeter Quecksilber,  $T$  die herrschende absolute Temperatur und  $a$  die angewendete Menge Substanz in Gramm ist.

<sup>1</sup> K. SCHAEFER: Chem.-Ztg. 1924, 48, 761. DRGM. 880434 der Firma Dr. H. Göckel in Berlin NW 6.

<sup>2</sup> A. VAN DER WERTH: Chem.-Ztg. 1928, 52, 23. DRGM. der Firma A. Dargatz in Hamburg 1.

<sup>3</sup> F. FRIEDRICHS: Chem.-Ztg. 1929, 53, 287. DRGM. 1046807 der Firma Greiner & Friedrichs G. m. b. H. in Stützerbach (Thür.).

<sup>4</sup> J. PRITZKER u. R. JUNGKUNZ: Chem.-Ztg. 1929, 53, 603. DRP 504940 der Firma Dr. Bender & Dr. Hobein in München u. Zürich.

<sup>5</sup> J. MASSON (Chem. News 1911, 103, 37) u. A. KORFF-PETERSEN (Zeitschr. f. Hygiene 1913, 75, 236; C. 1914, I, 71) bestimmen das gebildete Acetylen durch Druckmessung.

Die Umsetzung erfolgt praktisch jedoch nicht streng stöchiometrisch, was schon daraus zu erkennen ist, daß 1 ccm Acetylen bei 0° und 760 mm nach P. V. DUPRÉ<sup>1</sup> 0,001725 g, nach J. MASSON<sup>2</sup> 0,001714 g, nach W. JAKOWENKO<sup>3</sup> theoretisch aber 0,001607 g Wasser entspricht. Diese Unterschiede liegen in der Beschaffenheit des verwendeten Calciumcarbids begründet. Technisches Carbid gibt neben Acetylen auch Schwefelwasserstoff und Phosphorwasserstoff ab. Gutes Calciumcarbid muß von gleichmäßiger Beschaffenheit und hohem Wirkungswert sein. Am besten bestimmt man diesen Wirkungswert durch Einstellen des Carbids mit 0,7—1,0 g Ammoniumoxalat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O]. Der Wirkungswert ist auch sehr stark von der Temperatur abhängig; erst mit der Erhöhung der Temperatur strebt er bei reinem Calciumcarbid dem Werte 1 zu. Nach Versuchen von BLEYER und BRAUN ist das Temperaturoptimum 130°, nach v. WALTHER und BENTHIN<sup>4</sup> 140—150°.

β) Gravimetrisch. Die Bestimmung des gebildeten Acetylens erfolgt auf Grund des Gewichtsverlustes des verwendeten Apparates nach der Gasentwicklung<sup>5</sup> (S. 559).

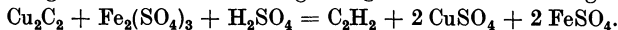
γ) Als Acetylenkupfer. Andere Meßverfahren beruhen darauf, daß das entstehende Acetylen mit ammoniakalischer Kupfer<sup>1</sup>-Lösung (nach E. R. WEAVER, S. 538) in Reaktion gesetzt wird. Es bildet sich unlösliches Acetylenkupfer, das nach verschiedenen Methoden bestimmt werden kann.

Gravimetrisch<sup>6</sup>. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und bis zum Verschwinden der Kupferreaktion (Prüfung mit Schwefelwasserstoff) mit 2% igem Ammoniak gewaschen. Der Niederschlag wird in ein Becherglas gespritzt und in 2 N.-Schwefelsäure gelöst. Nicht aus dem Auffangegefäß herausspülbare Anteile von Acetylenkupfer werden mit 2 N.-Schwefelsäure herausgelöst und mit der Hauptmenge vereinigt. Die Lösung wird mit Schwefelwasserstoff gesättigt, der Niederschlag durch dasselbe Filter filtriert, ausgewaschen, im Porzellantiegel gegläht und als CuO gewogen. 1 H<sub>2</sub>O entspricht 1 CuO oder 1 g CuO ist äquivalent 0,2264 g H<sub>2</sub>O.

Das Kupfer kann auch mit Natronlauge gefällt werden.

Titrimetrisch<sup>7</sup>. Der Niederschlag wird abfiltriert und gewaschen, wie oben angegeben ist. Da sehr leicht Oxydation von Acetylenkupfer eintritt, muß dafür gesorgt werden, daß der Niederschlag nicht trocken wird. Der Niederschlag wird durch eine angesäuerte Lösung von Ferrisulfat in Lösung gebracht (900 ccm Wasser + 100 ccm konzentrierte Schwefelsäure + 50 g Ferrisulfat oder 85 g Eisenammoniumalaun). Die Vorlage wird mit 20 ccm dieser Lösung ausgespült. Die vereinigten Lösungen werden auf 100 ccm aufgefüllt und mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung titriert.

Durch Zusatz der Eisenlösung wird statt des unbeständigen Cuprosulfates das beständigere Ferrosulfat gebildet. Die Umsetzung erfolgt nach der Gleichung:



1 H<sub>2</sub>O entspricht also 1 FeSO<sub>4</sub>; 1 ccm 0,1 n KMnO<sub>4</sub> ist äquivalent 1,802 mg H<sub>2</sub>O.

Colorimetrisch<sup>8</sup>. Man fängt das entstehende Acetylen in geeigneten Lösungsmitteln z. B. Methyl- oder Äthylalkohol auf (vgl. die Methode von SCHÜTZ und KLAUDITZ, S. 560) und gibt eine bestimmte Menge ammoniakalischer Kupfer<sup>1</sup>-Lösung hinzu. Die dabei auftretende Färbung wird mit Standardlösungen von Methylrot verglichen.

## b) Vorzüge und Mängel des Verfahrens.

Die Vorzüge des Calciumcarbid-Verfahrens liegen:

1. in der Benutzung sehr kleiner Substanzmengen,
2. in der Schnelligkeit der Ausführung und

<sup>1</sup> P. V. DUPRÉ: *Analyst* 1906, **31**, 213; *C.* 1906, **II**, 913.

<sup>2</sup> J. MASSON: *Chem. News* 1911, **103**, 37; *C.* 1911, **I**, 588.

<sup>3</sup> W. JAKOWENKO: *Z.* 1925, **49**, 360.

<sup>4</sup> v. WALTHER u. BENTHIN: *Braunkohlenarchiv* 1929, **Nr. 23**, 110.

<sup>5</sup> RIVETT: *Chem. News* 1911, **104**, 261; F. H. CAMPBELL: *Journ. Soc. chem. Ind.* 1913, **32**, 67; *C.* 1913, **I**, 1138; A. CANTZLER, S. ROTHSCHILD: *Z.* 1927, **53**, 425.

<sup>6</sup> W. BOLLER: *Chem.-Ztg.* 1926, **50**, 537.

<sup>7</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. MASCHMANN: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1920, **53**, 939.

<sup>8</sup> H. HARTLEY u. H. R. RAIKES: *Journ. Chem. Soc. London* 1925, **127**, 524.

3. darin, daß gegenüber der üblichen Trockenmethode weniger Fehlerquellen vorhanden sind (Ammoniumsalze verlieren kein Ammoniak; Nichtflüchtigkeit ätherischer Öle und anderer flüchtigen Substanzen).

Die Mängel haben zum Teil ihren Grund in der Beschaffenheit der zu untersuchenden Probe: Biokolloide enthaltende Stoffe absorbieren Wasser, welches daher nicht erfaßt wird (Sojabohnen<sup>1</sup>); Substanzen mit Hydratwasser verhalten sich ganz verschieden; einige verlieren ihr Wasser vollständig, andere nur zum Teil, wieder andere überhaupt nicht.

Weiter ist die Genauigkeit in hohem Maße von der Meßapparatur abhängig.

Bezeichnet man den Fehler in der Meßapparatur mit  $m_i$ , den der Wasserbestimmung mit  $m_w$  und den der Probenentnahme mit  $m_p$ , so ist:

$$m_w^2 = m_i^2 + m_p^2 \quad \text{oder} \quad m_w = \sqrt{m_i^2 + m_p^2}.$$

Wird  $m_i$  sehr klein, also  $m_i^2$  annähernd Null, so ist  $m_w = \sqrt{m_p^2} = m_p$ , d. h. bei einer Idealapparatur würde der Fehler der Wasserbestimmung identisch sein mit dem Fehler der Probenentnahme. Ist hingegen  $m_p$  sehr klein,  $m_p^2$  also annähernd gleich Null, so ist  $m_w = \sqrt{m_i^2} = m_i$ . Bei kleinem Fehler der Probenentnahme wäre also der Fehler der Wasserbestimmung gleich dem Instrumentenfehler.

### c) Ausführung der Bestimmung.

α) Volumetrisch. W. JAKOWENKO<sup>2</sup> benutzt den in Abb. 22 dargestellten Apparat. In das Rohr *a* gibt man bis zu 1 g Substanz, in das Rohr *b* gepulvertes Calciumcarbid. Durch Seitwärtsneigen des Apparates wird das Carbid mit der Substanz zunächst bei Zimmertemperatur in Berührung gebracht. Das entstehende Acetylen wird in einer MOHRSCHEN Meßbürette oder mittels der Gasbürette von LUNGE (*AB*) über Quecksilber aufgefangen. Durch Eintauchen des Rohrs *a* in ein auf 100° erwärmtes Sandbad wird die Reaktion zu Ende geführt. Die Dauer einer Bestimmung beträgt 10—15 Minuten.

β) Gravimetrisch. RIVETT<sup>3</sup> wägt sein Gefäß (Abb. 23) vor Beginn und nach Beendigung des Versuches. Die Substanz (1—2 g) befindet sich in *A*, die Anordnung des Röhrens *D* ist folgende:

$a_1$ ,  $a_2$  ist Glaswolle, *b* fein granuliertes Calciumcarbid, *c* gepulvertes Calciumcarbid, das mit einem dünnen Wachsüberzug gegen *A* abgeschlossen ist. Bei Beginn des Versuches wird bei *D* schwach erwärmt, worauf die Wachsschicht schmilzt und das gepulverte Carbid auf die Substanz fällt. An *C* ist eine mit Schwefelsäure gefüllte Waschflasche geschaltet. Beginnt die Gasentwicklung langsamer zu werden, wird *A* in ein Wasserbad getaucht. Nach Beendigung des Versuches wird abgekühlt und der Apparat mit trockener Luft gefüllt und zurückgewogen. 1 g Gewichtsverlust (Acetylen) entspricht 1,432 g Wasser.



Abb. 22.  
Wasserbestimmung  
nach JAKOWENKO.

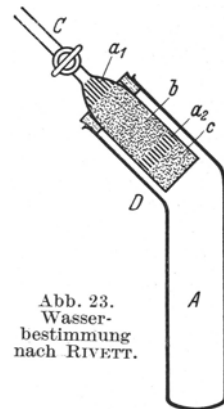


Abb. 23.  
Wasser-  
bestimmung  
nach RIVETT.

<sup>1</sup> A. N. LEBEDEV u. T. W. PEREWERSEWA: Schrift. zentral. biochem. Forsch.-Inst. Nahr.-Genußmittelind. (russ.) 1931, 1, 200; C. 1932, II, 1986.

<sup>2</sup> W. JAKOWENKO: Z. 1925, 49, 360.

<sup>3</sup> RIVETT: Chem. News 1911, 104, 261. — Vgl. F. H. CAMPBELL: Journ. Soc. chem. Ind. 1913, 32, 67; C. 1913, I, 1138.



A. CANTZLER und S. ROTHSCHILD<sup>1</sup> bestimmen ebenfalls die Menge des entwickelten Acetylen durch den Gewichtsverlust des Apparates (Abb. 24) nach der Einwirkung des Calciumcarbids; sie empfehlen das Verfahren namentlich für Substanzen, die noch andere flüchtige Stoffe als Wasser enthalten (Ätherische Öle in Gewürzen usw.).

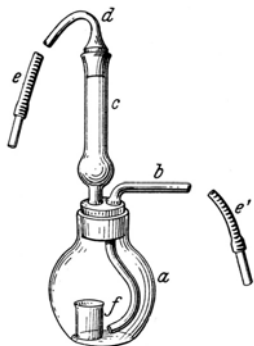


Abb. 24.  
Wasserbestimmung nach  
CANTZLER und ROTHSCHILD.

In das Korbchen *a* von etwa 50 ccm Inhalt gibt man etwa 3 g Substanz und in das kleine Becherglas *f* von etwa 5 ccm Inhalt 5 g gekörntes Calciumcarbid. Das Trockenröhrchen *c* (mit dem Ableitungsrohr *d*) wird mit gekörntem Calciumcarbid<sup>2</sup> auf einer Glaswolleunterlage gefüllt und nach dem Verschluss von *b* und *d* mit den Gummiverschlüssen *e* und *e'* wird der Apparat gewogen. Darauf wird *e* durch ein Chlorcalciumrohr ersetzt und an *e'* eine zunächst mit einem Quetschhahn abgesperrte Gaswaschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure und ein schichtweise mit Chlorcalcium und Natronkalk gefüllter Trockenturm angeschlossen. Durch Bewegen des Korbchens *a* wird das Becherglas *f* umgeworfen und das Carbid mit der Substanz gemischt. Beim Nachlassen der Gasentwicklung wird das Korbchen *a* in ein Toluolbad gestellt, das langsam auf 60° — bei Substanzen mit flüchtigen Stoffen — bis 100° angeheizt wird. Nach genügender Einwirkungsdauer (etwa 1 Stunde) wird das Toluolbad entfernt. Nach dem Abkühlen des Apparates

wird an das Chlorcalciumrohr bei *e* noch eine Gaswaschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure und eine schwach wirksame Absaugevorrichtung angeschlossen, mittels welcher man nach Öffnung des Quetschhahnes einen langsamen Strom trockener und kohlenstofffreier Luft zur Entfernung des Acetylen durch den Apparat leitet. Hierauf wird der Apparat wieder mit den Gummiverschlüssen *e* und *e'* verschlossen und gewogen.

1 g Gewichtsverlust (Acetylen) entspricht 1,427 g<sup>3</sup> Wasser.

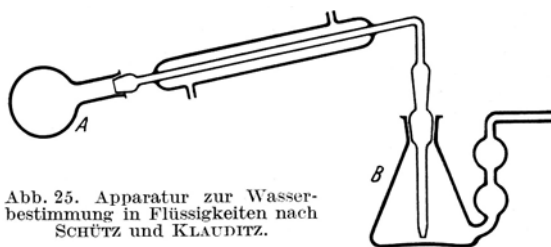


Abb. 25. Apparatur zur Wasserbestimmung in Flüssigkeiten nach  
SCHÜTZ und KLAUDITZ.

$\gamma$ ) Als Acetylenkupfer.  
F. SCHÜTZ und W. KLAUDITZ<sup>4</sup> bestimmen in einer von ihnen angegebenen Apparatur (Abbildung 25) geringe Mengen von Wasser in Flüssigkeiten.

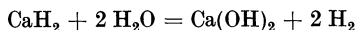
Die Substanz (10–40 ccm) wird mit Calciumcarbid im Kolben *A* am Rückflußkühler 1½ bis 2 Stunden gekocht, das entweichende Acetylen wird in 30 bis

40 ccm Aceton in Kolben *B* aufgefangen. Nach Beendigung des Versuches wird die Acetonlösung mit 50 ccm Kupfer<sup>1</sup>-Lösung nach WEAVER versetzt und das entstandene Acetylenkupfer maßanalytisch bestimmt.

W. BOLLER<sup>5</sup> hat einen besonderen Apparat zur Bestimmung von Wasser in Ölen beschrieben.

## 2. Calciumhydrid-Methode.

Der Vorteil der Calciumhydridmethode beruht darauf, daß gegenüber dem Calciumcarbidverfahren doppelt soviel Gas entwickelt wird, wie aus der Gleichung:



<sup>1</sup> A. CANTZLER u. S. ROTHSCHILD: Z. 1927, 53, 425. Der Apparat ist von der Firma C. Desaga in Heidelberg zu beziehen.

<sup>2</sup> Das Calciumcarbid in *c* soll zur Umsetzung des etwa mit dem Acetylen entweichenden Wassers dienen.

<sup>3</sup> Diesen gegenüber der theoretischen Zahl 1,385 g erhöhten Wert führen CANTZLER und ROTHSCHILD auf die Bindung von Wasser durch das entstehende Calciumhydroxyd zurück, das beim Erwärmen auf 100° nicht entfernt wird. Andere Autoren geben den Faktor mit 1,432–1,449 an.

<sup>4</sup> F. SCHÜTZ u. W. KLAUDITZ: Zeitschr. angew. Chem. 1931, 44, 42.

<sup>5</sup> W. BOLLER: Petroleum 1927, 23, 146.

ersichtlich ist. Das verwendete Hydrid muß nitridfrei sein, da Calciumnitrid mit Wasser unter Bildung von Ammoniak reagiert. Die Menge etwa vorhandenen Nitrids bestimmt man durch Titration des gebildeten Ammoniaks.

Die Reaktion erfolgt in geeigneten Reaktionsgefäßen, von denen Abb. 26 das von CH. K. ROSENBAUM und J. H. WALTON<sup>1</sup> für Flüssigkeiten, Abb. 27 das von H. BROCHE und W. SCHEER<sup>2</sup> und Abb. 28 das von O. NOTEVARP<sup>3</sup> zeigen. Der entstehende Wasserstoff wird im Eudiometer aufgefangen; eine von NOTEVARP für gut befundene Sperrflüssigkeit ist wasserfreies Glykol, das ohne Einfluß auf Kautschuk ist und lange Zeit in der Apparatur unverändert stehen bleiben kann.

Da jedoch Glykol etwas flüchtig ist und mit Calciumhydrid unter Bildung von Calciumglykolat und Wasserstoff reagiert, unterbindet man diese, wenn auch geringfügige Flüchtigkeit durch Überschichten des Glykols mit Paraffinöl und durch Zwischenschalten eines gebogenen Capillarrohres zwischen Reaktionsgefäß und Eudiometer.

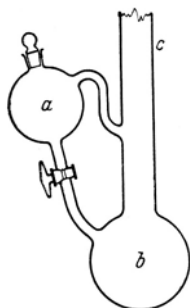


Abb. 26. Nach ROSENBAUM und WALTON für Flüssigkeiten.  
a Untersuchungssubstanz,  
b Calciumhydrid,  
c führt zum Eudiometer.

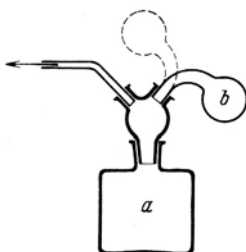


Abb. 27.  
Nach BROCHE und SCHEER.  
a Untersuchungssubstanz,  
b Calciumhydrid.

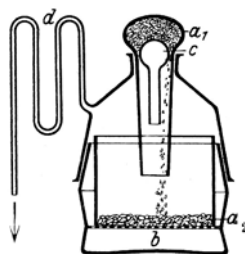


Abb. 28. Nach NOTEVARP.  
a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> Calciumhydrid, b Untersuchungssubstanz, c Glasstab zur Lockerung des Calciumhydrids a<sub>1</sub>, d Capillarrohr.

Abb. 26—28. Apparate zur Wasserbestimmung nach der Calciumhydridmethode.

1 ccm Wasserstoff entspricht bei 0° und 760 mm Druck 0,749 mg Wasser.

Da die quantitative Erfassung des Wasserstoffs zu lange dauert, andererseits aber die Wasserstoffabgabe kontinuierlich verläuft, stellt man von Zeit zu Zeit das Volumen des Wasserstoffs fest und extrapoliert auf den Endwert (NOTEVARP).

Die Vorteile dieses Verfahrens bestehen darin, daß die Wasserbestimmung auch in solchen Stoffen (Benzol, Toluol usw.) möglich ist, in denen sie sonst nur unsicher erfolgen kann.

### 3. Sonstige Methoden.

Außer Calciumcarbid und -hydrid ist noch eine Reihe anderer Stoffe für Wasserbestimmungen empfohlen worden:

a) Magnesiummethyljodid liefert mit Wasser Methan, das im Eudiometer aufgefangen wird. TH. ZEREWITNOFF<sup>4</sup>, der diese Methode ausgearbeitet hat, verwendet Pyridin zum Ausziehen der Substanz, das dann mit Magnesiummethyljodid behandelt wird. Die Methode ist von A. TAUBMANN<sup>5</sup> an Kohle, Koks, Torf, Naphtha, Mineralöl geprüft worden. Sie ist anwendbar bei Stoffen, die selbst in Pyridin nicht löslich sind und nicht die Gruppen OH, NH, NH<sub>2</sub> und SH aufweisen.

Man verwendet ähnliche Reaktionsgefäße, wie JAKOWENKO oder BROCHE (S. 559 und oben) sie angeben. Für die Umrechnung der aufgefangenen Kubikzentimeter Methan in Wasser

<sup>1</sup> CH. K. ROSENBAUM u. J. H. WALTON: Journ. Amer. Chem. Soc. 1930, 52, 3570.

<sup>2</sup> H. BROCHE u. W. SCHEER: Brennstoffchemie 1932, 13, 281.

<sup>3</sup> O. NOTEVARP: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 21.

<sup>4</sup> TH. ZEREWITNOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1911, 50, 680.

<sup>5</sup> A. TAUBMANN: Zeitschr. analyt. Chem. 1928, 74, 161.

müssen bei  $t = 18^{\circ}$  vom beobachteten Druck 16 mm für die Dampfspannung des Pyridins abgezogen werden.

b) Die Verwendung fein geschnittener Alkalimetalle ist wegen der großen Energie, mit der die Reaktion unter Umständen verläuft, hauptsächlich auf Kohlenwasserstoffe beschränkt. Langsamer erfolgt die Wasserstoffbildung bei Gebrauch von Alkali amalgam oder metallischem Calcium (L. LOSANA<sup>1</sup>).

c) Für Alkohole ist der Gebrauch von Aluminiumäthylat von Vorteil, da es nicht mit Alkoholen reagiert. Das entstandene Aluminiumhydroxyd wird filtriert und gegläht (HENLE<sup>2</sup>).

Die auf S. 538 angegebene Methode für Alkohol, Bildung von Natriumformiat bei Zugabe von Natriumäthylat und Ameisensäureäthylester, kann für quantitative Bestimmungen benutzt werden. Natriumformiat reduziert quantitativ Quecksilberchlorid zu Quecksilberchlorür. Bei größerem Wassergehalt läßt sich das Natriumformiat oxydations-titrimetrisch bestimmen (F. ADICKES<sup>3</sup>).

Natrium- bzw. Kaliumäthylat geben mit Wasser Natrium- bzw. Kaliumhydroxyd, die zugesetzten Essigester verseifen. Die Verseifung ist irreversibel. Die Genauigkeit soll nach E. L. SMITH<sup>4</sup>  $\pm 0,01\%$  betragen.

Behandelt man nach MÜLLER<sup>5</sup> die Probe mit Essigsäure bekannter Konzentration für die Dauer von 2 Minuten, filtriert dann und titriert mit 0,5 N.-Natronlauge, so entsprechen die verbrauchten Kubikzentimeter Lauge dem Wassergehalt. Die Genauigkeit dieser Methode beträgt  $\pm 0,5\%$ .

## E. Sonstige Verfahren der Wasserbestimmung.

Außer den unter A—D beschriebenen Verfahren der Wasserbestimmung gibt es noch eine Reihe von Verfahren, die meist im chemischen Laboratorium weniger gebräuchlich, sondern mehr für technische Zwecke geeignet und nur für bestimmte Substanzen anwendbar sind.

Die wichtigsten dieser Verfahren, soweit sie auch für Lebensmittel in Frage kommen, sind folgende:

**1. Wasserbestimmung mittels der Dielektrizitätskonstanten.** Eine erst neuerdings bekannt gewordene Methode ist die Bestimmung des Wassergehaltes einer Substanz durch Messung der Dielektrizitätskonstanten. Diese an sich elegante Methode bedarf noch der Verbesserungen, sie hat aber schon so weit Eingang in die Praxis gefunden, daß sie hier näher beschrieben werden soll.

Zum Begriff der Dielektrizitätskonstanten ist kurz folgendes zu bemerken: Die Kraft, mit der zwei parallele, elektrisch geladene Metallplatten einander anziehen, ist abhängig von dem Medium, das sich zwischen diesen Platten befindet. Im Vakuum ist diese Kraft gleich  $K$ ; bei einem anderen Zwischenmedium hängt sie von der Natur dieses Mediums ab; sie ist gleich  $K/D$ , wobei  $D$  die Dielektrizitätskonstante des Mediums ist. Die meisten Stoffe, Gase, organischen Verbindungen usw. besitzen eine niedrige, Wasser hingegen eine hohe Dielektrizitätskonstante. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht:

|                              | Dielektrizitäts-<br>konstante |                          | Dielektrizitäts-<br>konstante |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Luft und Gase . . . . .      | etwa 1                        | Stärke . . . . .         | 10                            |
| Papier . . . . .             | 2—3                           | Äthylalkohol . . . . .   | 27                            |
| Saccharose . . . . .         | 5                             | Glycerin . . . . .       | 56                            |
| Cellulose . . . . .          | 6,5                           | Wasser bei 20° . . . . . | 81                            |
| Dextrin und Casein . . . . . | 8                             | Eis . . . . .            | 3                             |

Die außerordentlich hohe Dielektrizitätskonstante des Wassers ist darauf zurückzuführen, daß das Wasser dipolaren Charakter hat. Es stellt sich im elektrischen Felde zwischen den beiden Platten eines Kondensators so ein, als ob das zweifach negativ geladene Sauerstoffion zum positiven Pol, die beiden positiv geladenen Wasserstoffionen zum negativen Pol zeigten. Eis hingegen hat eine sehr kleine Dielektrizitätskonstante.

<sup>1</sup> L. LOSANA: Giorn. chim. ind. ed appl. 1923, 4, 570; C. 1923, II, Techn. Teil 495.

<sup>2</sup> HENLE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1920, 53, 719.

<sup>3</sup> F. ADICKES: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 2753.

<sup>4</sup> E. L. SMITH: Journ. Chem. Soc. London 1927, 1284.

<sup>5</sup> A. FABER: Zeitschr. angew. Chem. 1929, 42, 406. — C. D. DAHLE: Mühle 1930, 67, 412.

Von dieser Eigenschaft des Wassers macht die Methode Gebrauch. Man füllt einen Kondensator mit der zu untersuchenden Substanz und mißt nach geeigneten Verfahren seine Kapazität. Ist die Kapazität eines Kondensators im Vakuum  $c$ , so beträgt sie  $c \cdot D$  bei einem Medium mit der Dielektrizitätskonstanten  $D$ .

Die Messung der Kapazität kann mit der WHEATSTONESchen Brücke erfolgen, wo die unbekannte Kapazität mit einer bekannten verglichen wird. Das hier in Frage kommende Verfahren mißt die unbekannte Kapazität jedoch unter Verwendung einer Elektronenröhre und eines Wechselstromkreises genügend hoher Frequenz. Verfahren dieser Art sind von E. F. BURTON und A. PITT<sup>1</sup> und von E. BERLINER und R. RÜTER<sup>2</sup> ausgearbeitet worden; besonders letzteres Verfahren<sup>3</sup> verdient Beachtung.

Abb. 29 zeigt die Schaltung: Die im Sendekreis *I* erzeugte Schwingung, deren Frequenz deswegen sehr hoch gewählt wird, um die durch Leitfähigkeit des Materials hervorgerufenen Störungen weitgehendst auszuschalten, wird durch den aperiodischen Zwischenkreis *II* dem auf eine feste Welle abgestimmtem Resonanzkreis *III* übertragen. Das in Kreis *II* eingeschaltete Meßinstrument, ein Galvanometer, zeigt einen maximalen Ausschlag dann an, wenn in Kreis *I* und *III* gleiche Wellenlänge herrscht, also die maximale Schwingungsenergie durch den Zwischenkreis geht. Es können sich auch beide Schwingungen auslöschten; dann zeigt selbstverständlich das Galvanometer den geringsten Ausschlag an. Den maximalsten Ausschlag erreicht man dadurch, daß man bei einem mit dem zu messenden Kondensator parallel geschalteten Drehkondensator soviel herausdreht, bis die Schwingungen beider Kreise gleich sind. Die herausgedrehte Kapazität entspricht der unbekanntenen Kapazität. Da diese dem Wassergehalt der Substanz proportional ist und man andererseits nur die relative Größe der herausgedrehten Kapazität — sie ist an den Teilstrichen einer am Drehkondensator befindlichen Skala abzulesen — zu wissen braucht, läßt sich aus den abgelesenen Skalenteilen der Wassergehalt ermitteln.

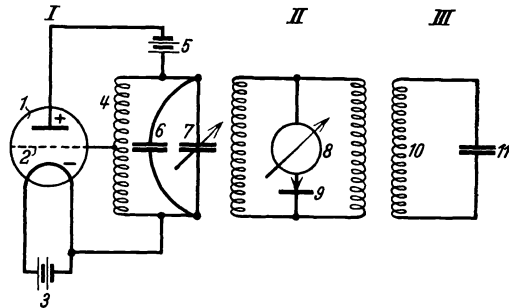


Abb. 29. Schaltung bei der Wasserbestimmung mittels der Dielektrizitätskonstanten.

1 Heizröhre, 2 Heizgitter, 3 Heizbatterie, 4 Induktionsspule, 5 Anodenbatterie, 6 Meßkondensator, 7 Drehkondensator, 8 Galvanometer, 9 Detektor, 10 Induktionsspule, 11 Konst. Kondensator.

Das Messungsergebnis ist von 4 Faktoren abhängig:

1. Von der Dielektrizitätskonstanten der chemischen Verbindungen der zu untersuchenden Substanz,
2. von der relativen Menge der einzelnen chemischen Bestandteile,
3. von dem relativen Wassergehalt der Substanz und
4. von dem Aggregatzustand des Wassers in der Substanz.

Unter diesen Umständen ist es verständlich, daß man für die verschiedenen Substanzen auch verschiedene Skalenteile trotz gleichen Wassergehaltes abliest. Es ist daher notwendig, für jede Substanzart, z. B. Mehle derselben Getreidesorte, Nahrungsmittel derselben Art, Braunkohlen desselben Flözes usw. Eich Tabellen aufzustellen, die die Abhängigkeit der Skalenteile vom Wassergehalt aufzeigen. Hat man die Eichkurve z. B. eines Weizenmehles aufgenommen, so genügt für jedes weitere Weizenmehl mit unbekanntem Wassergehalt die Ermittlung des entsprechenden Skalenteiles, um aus der Eichkurve die Prozente Wasser ablesen zu können.

<sup>1</sup> E. F. BURTON u. A. PITT: Canadian Journ. Res. 1929, 1, 155; C. 1929, II, 2122.

<sup>2</sup> E. BERLINER u. R. RÜTER: Zeitschr. ges. Mühlenwesen 1929, 5, 168 u. 6, 1.; Kolloid-Zeitschr. 1929, 47, 251.

<sup>3</sup> Es wurde am Frankfurter Forschungsinstitut für Getreidechemie G. m. b. H., Frankfurt a. M. ausgearbeitet und bei einem Preisausschreiben des Deutschen Braunkohlen-Industrie-Vereins 1928 mit dem 1. Preis ausgezeichnet.

Der Apparat ist außerordentlich handlich und einfach zu bedienen. Er ist in einem Koffer geschützt untergebracht. Die Substanz wird in geeigneter Weise in einen Kondensator, je nach dem zu erwartenden Wassergehalt von geringerer oder größerer Leerkapazität<sup>1</sup>, eingetragen, der Strom eingeschaltet und der Skalenteil abgelesen, bei dem das Galvanometer den höchsten (bei Auslöschung den niedrigsten) Stand zeigt. Die Dauer einer Bestimmung beträgt 1—2 Minuten.

Packungsdichte und Temperatur beeinflussen die Messung. Unterhalb 8—10% Wasser scheint auch die Luftfeuchtigkeit eine Rolle zu spielen. Die Packungsdichte soll möglichst konstant sein. Bei pulverförmigen oder körnigen Substanzen empfiehlt sich schichtweises Einstampfen. Eine Wägung der Substanz erübrigt sich.

Die Genauigkeit der Messung beträgt nach C. D. DAHLE<sup>2</sup>  $\pm 0,02\%$ . Erprobt ist die Methode für Getreide, Mehl, Braunkohle, Tabak, Futtermittel, Tee, Kaffee usw. Schwierigkeiten haben sich bislang noch bei Butter und Margarine, also bei Emulsionen, und bei stark leitenden Substanzen ergeben.

Nachteilig ist die für jede Substanzart besonders aufzunehmende Eichkurve, die außerdem mit größter Sorgfalt ausgeführt und von Zeit zu Zeit nachgeprüft werden muß. Temperatur, Packungsdichte und Luftfeuchtigkeit, ebenso das Alter der verwendeten Elektrodenröhren haben einen nicht geringen Einfluß auf die Bestimmung.

**2. Wasserbestimmung durch Messung des elektrischen Widerstandes.** Die Methode beruht darauf, daß die Größe des Widerstandes, den eine Substanz dem elektrischen Strom entgegensetzt, im wesentlichen abhängig ist von ihrem Wassergehalt.

Die Methode ist selbstverständlich beschränkt auf Stoffe, die im trockenen Zustande dem elektrischen Strom einen sehr großen Widerstand entgegensetzen. Über Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der verschiedenen Verfahren haben wir in der Literatur keine näheren Angaben gefunden. Sie werden wohl nur als Schnellmethoden von annähernder Genauigkeit in der Technik benutzt werden können. Vorgeschlagen sind solche Verfahren für Gewebe, Stoffe u. dgl. von L. ILMONEN<sup>3</sup>, für Holz von A. NOWAK<sup>4</sup>, für Formsand von F. TÖDT<sup>5</sup> und für Kohlen von H. HEINICKE<sup>6</sup>.

**3. Wasserbestimmung durch Messung der Leitfähigkeit.** K. FISCHBECK und E. EINECKE<sup>7</sup> bestimmen den Wassergehalt einer Substanz durch Behandeln mit Eisessig. Es bildet sich eine wasserhaltige Essigsäure, deren Leitfähigkeit bestimmt wird. Um der Beeinflussung durch eine etwaige Auflösung von Salzen aus der Substanz zu begegnen, wird das Filtrat ohne Konzentrationsänderung destilliert. Die Größe des Widerstandes wird mittels einer WHEATSTONESchen Brücke gemessen.

**4. Weitere Methoden.** Auf die Methoden der Wasserbestimmung mittels Calorimetrie durch Mischung mit konzentrierter Schwefelsäure<sup>8</sup> oder Mischung mit wasserfreiem Magnesiumsulfat<sup>9</sup>, durch Wasserdampfdruckbestimmung<sup>10</sup>, durch Kryoskopie und Ebullioskopie<sup>11</sup>, durch Bestimmung der Entmischungstemperatur<sup>12</sup> und durch Refraktometrie<sup>13</sup> kann hier nur verwiesen werden.

<sup>1</sup> Bei Flüssigkeiten verwendet man Tauchelektroden.

<sup>2</sup> C. D. DAHLE: Mühle 1930, 67, 412.

<sup>3</sup> L. ILMONEN: DRP. 263028. C. 1913, II, 835.

<sup>4</sup> A. NOWAK: Sperrholz 1929, 207; C. 1930, I, 1561.

<sup>5</sup> F. TÖDT: DRP. 517212.

<sup>6</sup> H. HEINICKE: DRP. 458927. C. 1928, I, 2895.

<sup>7</sup> K. FISCHBECK u. E. EINECKE: Zeitschr. Elektrochem. 1929, 35, 765.

<sup>8</sup> C. D. DAHLE: Mühle 1930, 67, 412.

<sup>9</sup> H. OERTEL u. H. PFUG: Chem.-Ztg. 1920, 44, 854; 1921, 45, 64; 1927, 51, 717; 1928, 52, 92.

<sup>10</sup> MITTELSTEINER: Braunkohle 1929, 28, 933, 959.

<sup>11</sup> ST. BARKOWSKI: Roczniki Chemji 1931, 11, 49, 269, 490; C. 1931, I, 2904; 1931, II, 2758, 2759.

<sup>12</sup> F. D. JANSEN u. W. SCHUTT: Chem. Weekbl. 1923, 20, 657. — M. M. RISING u. J. S. HICKS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, 48, 1929. — D. PETERS: Zeitschr. angew. Chem. 1927, 40, 1011. — M. DOLCH u. Mitarbeiter: Chem. Apparatur 1929, 16, 137, 151; C. 1930, I, 1500; Wissensch. Arch. Landw. A 1930, 4, 64; C. 1931, I, 973.

<sup>13</sup> R. v. WALTHER u. W. BIELENBERG: Braunkohlenarchiv 1929, Nr. 25, 17.

# Elementaranalyse.

Von

Professor **DR. K. TÄUFEL**-München.

Mit 25 Abbildungen.

Die „Elementaranalyse“ verfolgt das Ziel, die Art einer organischen Verbindung durch qualitative und quantitative Ermittlung der am Aufbau beteiligten Elemente zu erkennen. Hierfür kommen neben Kohlenstoff vor allem Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel, Halogen und Phosphor in Betracht; die anderen Grundstoffe spielen nur eine untergeordnete Rolle.

Über 300 000 organische Verbindungen sind bisher dargestellt worden. Unter Berücksichtigung der Isomeriemöglichkeiten wird verständlich, daß die bloße Kenntnis des elementaren Aufbaues einer hinsichtlich der Einheitlichkeit sichergestellten Verbindung meist nichts Endgültiges über ihren Charakter auszusagen vermag. Zur Lösung dieser Aufgabe müssen vielmehr weitere experimentelle Kriterien (Schmelzpunkt, Siedepunkt, Molekulargewicht, optisches Verhalten usw.) herangezogen werden.

Bei Gemischen von Substanzen, wie sie dem Lebensmittelchemiker vielfach entgegen-treten, kann die Feststellung der organischen Herkunft auf Grund der qualitativen Untersuchung wertvoll sein. Ob aber die quantitative Analyse einen Fortschritt in der Erkenntnis bedeutet, ist von Fall zu Fall zu entscheiden. Insbesondere muß die gleichbleibende Beschaffenheit des Stoffgemisches gewährleistet sein.

Die organische Elementaranalyse gliedert sich in qualitative und quantitative Verfahren, wobei erstere wie immer unbedingte Voraussetzung für die letzteren sind.

## I. Qualitative organische Elementaranalyse<sup>1</sup>.

**1. Kohlenstoff.** Der Gehalt einer Substanz an Kohlenstoff macht sich beim Erhitzen im trockenen Reagensglas<sup>2</sup> (Sauerstoffmangel) meist durch Ausscheidung von Kohle bemerkbar; auch beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure tritt dies oft ein. Beim vorsichtigen Erwärmen auf einem Platinblech oder einem Platindeckel (bei flüssigen oder leicht schmelzenden Verbindungen) erfolgt im allgemeinen zunächst Verkohlung und dann Entzündung unter Entwicklung brenzlich riechender Dämpfe.

Es ist aber zu bedenken, daß unzersetzt flüchtige Substanzen (Alkohol, Tetrachlorkohlenstoff usw.) beim Erhitzen auch ohne Kohleabscheidung rückstandslos verbrennen können.

Der eindeutige Nachweis des Kohlenstoffs wird durch dessen Oxydation zu Kohlendioxyd und der Charakterisierung des letzteren geführt. Zu diesem Zwecke mischt man die trockene Probe der Substanz (einige Milligramm) in einem Reagensrohr aus schwer schmelzbarem Glas innig mit ausgeglühtem gepulvertem Kupferoxyd<sup>3</sup> und überschichtet nochmals damit. Das Rohr, das waagrecht mittels einer Klammer an einem Stativ befestigt wird, verschließt man mit einem Korkstopfen, der in seiner Bohrung ein rechtwinklig abwärts gebogenes Glasrohr trägt. Letzteres taucht mit seinem Ende in ein Gefäß mit Barytwasser. Man erhitzt, vor der Substanz beginnend, vorsichtig mit der Flamme des Bunsen-

<sup>1</sup> Die Ausführungen beschränken sich auf den Nachweis der wichtigsten Elemente.

<sup>2</sup> Man beginnt mit dem Erhitzen des Rohres von oberhalb der Substanz her.

<sup>3</sup> Flüssigkeiten läßt man vom Kupferoxyd aufsaugen.

brenners. Es tritt Verbrennung unter Bildung von Kohlendioxyd<sup>1</sup> ein, das sich im Barytwasser infolge Carbonatbildung durch Trübung oder Niederschlag anzeigt.

Verfahren zum mikroanalytischen Nachweis des Kohlenstoffs gibt F. EMICH<sup>2</sup> an; hierbei sind bei Verwendung eines ganz oder einseitig geschlossenen Röhrchens 10  $\gamma$  der Untersuchungssubstanz ausreichend. Soll mit sehr kleinen Mengen große Sicherheit des Nachweises erreicht werden, dann verbrennt man im Sauerstoffstrom zu Kohlendioxyd und weist letzteres als Calciumcarbonat nach<sup>2</sup>.

**2. Wasserstoff.** Der Gehalt der Substanz an diesem Element gibt sich bei den vorstehend genannten Reaktionen durch Abscheidung von Wasser an den kälteren Teilen des Reagensglases zu erkennen. Um Täuschungen hintanzuhalten, ist es notwendig, die fein gepulverte Untersuchungssubstanz vorsichtig zu trocknen (evakuierter Exsiccator mit konzentrierter Schwefelsäure oder Phosphorsäureanhydrid, nötigenfalls Hochvakuum) und nur frisch ausgeglühtes Kupferoxyd zu benutzen.

**3. Sauerstoff.** Einfache Verfahren zur Erkennung des Sauerstoffes sind nicht bekannt. Das Auftreten von Wasser beim Erhitzen einer Substanz im Wasserstoffstrom bei Gegenwart einer Kontaktmasse kann als Nachweis für Sauerstoff gelten (H. TER MEULEN und J. HESLINGA, s. S. 593). In der quantitativen Elementaranalyse ermittelt man seine Menge meist indirekt durch Ergänzung der Summe der andern Bestandteile zu 100.

**4. Stickstoff.** Stickstoffreiche Verbindungen erzeugen beim Verbrennen vielfach einen charakteristischen Geruch (wie versengte Haare). Manchmal tritt auch Geruch nach Ammoniak auf, dessen Bildung durch Zugabe alkalischer Stoffe begünstigt wird.

Man mischt die fein gepulverte Substanz mit der 8fachen Menge an gebranntem Kalk (oder Natronkalk) und erhitzt im Reagensglas. Das entweichende Ammoniak ist durch den Geruch, durch die Bläuung von Lackmuspapier, durch die Bräunung von Curcumapapier usw. zu erkennen. Die Reaktion versagt bei gewissen Verbindungen, vor allem bei solchen, deren Stickstoff an Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist (Nitro-, Azo-, Diazoverbindungen usw.). Zur Behebung dieser Störungen setzt man außer Kalk noch gepulvertes Kupfer zu und verfährt dann wie sonst. Eine mikroanalytische Ausführung der Kalkreaktion beschreibt F. EMICH<sup>2</sup>; 0,1  $\gamma$  Stickstoff sind damit noch erkennbar.

Die meist angewandte qualitative Probe auf Stickstoff beruht auf seiner Überführung in Cyanverbindungen: Eine kleine Menge der trocknen Substanz (10—20 mg) wird im Reagensglas mit einem erbsengroßen Stück metallischem Kalium (Natrium wirkt nicht ganz sicher) vorsichtig über freier Flamme erhitzt<sup>3</sup>. Bei leicht flüchtigen Stoffen schmilzt man erst das Kalium, damit die Dämpfe der dann erhitzten, darunter liegenden Substanz durch die heiße Kaliumschmelze hindurchgehen müssen, und erhitzt schließlich noch 2 Minuten lang kräftig; überschüssiges Kalium bewahrt vor der Oxydation zum Cyanat. Das heiße Röhrchen taucht man mit dem untern Ende in eine Porzellanschale mit 3—4 ccm Wasser (Abzug). Hierbei zerspringt es, wobei sich noch vorhandenes unverändertes Kalium entzünden kann. Man filtriert und untersucht die

<sup>1</sup> Enthält die Substanz Alkalien oder Erdalkalien, dann ist Zusatz von Kaliumdichromat in gepulverte Form notwendig, um das Kohlendioxyd vollständig auszutreiben.

<sup>2</sup> F. EMICH: Mikrochemisches Praktikum, 2. Aufl. S. 102. München: J. F. Bergmann 1931.

<sup>3</sup> Vorsicht walten lassen, da gewisse Verbindungen der Salpetersäure, ferner Halogen-derivate beim Erhitzen mit Kalium detonieren können; durch Mischen der Substanz mit wasserfreiem Natriumcarbonat wird diese Gefahr im wesentlichen behoben.

alkalische (Prüfen!) Lösung, die bei Anwesenheit von Stickstoff Kaliumcyanid enthält, mittels der Berlinerblau-Reaktion. Zu diesem Zwecke setzt man einige Tropfen Ferrosulfat- und Ferrichloridlösung<sup>1</sup> zu und erhitzt 2 Minuten lang zum Sieden. Beim Ansäuern des Reaktionsgemisches mit Salzsäure entsteht dann Berlinerblau; bei geringem Stickstoffgehalt kann es erst nach längerem Stehen zur Abscheidung von blauen Flöckchen kommen.

Eine andere Art des Cyanidnachweises besteht darin, daß man die alkalische Aufschlußlösung mit gelbem Schwefelammonium zur Trockne eindampft und nach dem Aufnehmen mit Wasser und der Zugabe von Salzsäure mit Ferrichlorid versetzt; war Stickstoff vorhanden, so tritt die blutrote Farbe des Ferrirhodanids auf.

Diese von LASSAIGNE<sup>2</sup> bereits im Jahre 1843 vorgeschlagene Probe ist bei positivem Ausfall beweisend; sie kann aber mitunter versagen. Stark schwefelhaltige Substanzen z. B. liefern dabei Kaliumrhodanid, und der Nachweis als Berlinerblau gelingt in diesen Fällen nur bei Anwendung eines großen Kaliumüberschusses. Diazoverbindungen, die ihren Stickstoff schon bei relativ niedriger Erhitzungstemperatur verlieren, geben keine Reaktion; bei ihnen ist eine Schmelze mit Natriumperoxyd angezeigt. Dabei entsteht Nitrat, das in bekannter Weise nachgewiesen wird. Auch sehr flüchtige Substanzen, die unter Umständen unzersetzt entweichen, können bei der Probe nach LASSAIGNE trotz ihres Stickstoffgehaltes einen negativen Befund vortäuschen.

**5. Schwefel.** Bei gewissen schwefelhaltigen Stoffen, z. B. Aminosäuren, Proteinen, wird der Sulfidschwefel beim Erhitzen mit Alkalilauge als Schwefelwasserstoff abgespalten und durch die gleichzeitig zugesetzte Bleiacetatlösung als Bleisulfid ausgefällt; je nach dem Schwefelgehalt erhält man eine braune bis schwarze Färbung bzw. einen schwarzen Niederschlag.

Der Nachweis des Schwefels kann in zweckmäßiger Weise mit der Probe nach LASSAIGNE verbunden werden. Die klar filtrierte alkalische Lösung des Aufschlusses bringt bei Anwesenheit von Schwefel auf einer blanken Silbermünze Schwärzung hervor. Mit einer frisch bereiteten Lösung von Nitroprussidnatrium entsteht eine violette Färbung. Auf Zugabe von Bleiacetatlösung erfolgt nach dem Ansäuern mit Essigsäure Braun- oder Schwarzfärbung bzw. Ausscheidung eines schwarzen Niederschlages.

Den mikroanalytischen Nachweis des Schwefels führt F. EMICH<sup>3</sup> durch oxydierende Veraschung der Substanz mit der 4—6fachen Menge einer Natriumcarbonat-Kaliumchloratmischung (6 Teile Natriumcarbonat + 1 Teil Kaliumchlorat). Die filtrierte Lösung des Aufschlusses prüft man nach dem Ansäuern mit Salzsäure auf Sulfation mittels einer Bariumchloridlösung.

Bei leicht flüchtigen oder sehr schwer zersetzbaren Substanzen kann bei offener Oxydation mit einer Mischung aus Natriumcarbonat und Salpeter, mit Natriumperoxyd usw. der Schwefel teilweise entweichen. Man führt dann die Zersetzung mit rauchender Salpetersäure im Bombenrohr aus (Erhitzen auf 200—300°).

**6. Halogene.** a) Die zu untersuchende Substanz wird in einer Porzellanschale, einem Platintiegel oder auf einem Platindeckel vorsichtig verbrannt; Flüssigkeiten läßt man von einem Stück halogenfreien Filtrierpapier aufsaugen und verbrennt letzteres. Die aufsteigenden Verbrennungsgase fängt man unter einem umgestülpten, durch Ausschwenken mit Wasser angefeuchteten größeren Becherglas auf. Hernach spült man es mit wenig Wasser aus und filtriert. Das

<sup>1</sup> Der Zusatz von Ferrichlorid ist vielfach entbehrlich, da beim Erhitzen das zugesetzte Ferrosulfat teilweise zur Ferriverbindung oxydiert wird.

<sup>2</sup> Über eine Änderung der Probe nach LASSAIGNE siehe V. CASTELLANA: Z. 1905, 10, 690.

<sup>3</sup> F. EMICH: Mikrochemisches Praktikum, 2. Aufl. S. 107. München: J. F. Bergmann 1931.



mit Salpetersäure angesäuerte Filtrat gibt auf Zusatz von Silbernitratlösung bei halogenhaltiger Ausgangssubstanz die entsprechende Halogenfällung.

b) Auf einem ausgeglühten Kupferdraht bringt man eine kleine Menge der Substanz in die nichtleuchtende Flamme. Tritt nach kurzem Aufleuchten eine anhaltende, intensiv grün bis grünblaue Flammenfärbung auf, dann ist Halogen anwesend. An Stelle des Kupferdrahtes kann auch ein Platindraht verwendet werden, an dem man etwas Kupferoxyd befestigt hat (Probe nach BELSTEIN).

c) Bei Abwesenheit von Stickstoff und Schwefel<sup>1</sup> kann man zur Prüfung auf Halogene auch die Probe nach LASSAIGNE benutzen. Man säuert das Filtrat mit Salpetersäure an und setzt Silbernitratlösung zu.

Sind Stickstoff und Schwefel anwesend, dann mischt man in einem Reagensglas die Substanz mit der etwa 6fachen Menge von halogenfreiem Calciumoxyd und überschichtet außerdem damit. Man erhitzt zuerst den übergeschichteten Kalk, dann das Substanzgemenge. Der geglühte Rückstand wird mit Wasser abgelöscht und in verdünnter Salpetersäure gelöst. Man filtriert und prüft mit Silbernitrat auf Halogene.

Die Differenzierung des positiven Halogen-Nachweises nach Chlor, Brom oder Jod erfolgt gemäß den üblichen Methoden der analytischen Chemie.

**7. Sonstige Elemente.** Die für den Lebensmittelchemiker wichtige Prüfung organischer Substanzen auf Phosphor (Phosphatide, Sphingomyeline, Nucleoproteide, Inosit, usw.) führt man qualitativ meist in der Weise aus, daß man die Substanz, mit einem Überschuß einer Verreibung von Natriumcarbonat und Kaliumnitrat vermischt, in einer Porzellanschale allmählich und vorsichtig in geschmolzenen Salpeter einträgt. Die erkaltete Schmelze wird nach Zugabe von Salpetersäure unter Erhitzen in Wasser gelöst. Nach dem Filtrieren prüft man mit Ammoniummolybdatlösung auf Phosphorsäure. An Stelle von Salpeter kann man auch Natriumperoxyd als Oxydationsmittel benutzen. Fürchtet man Verluste zu erleiden, dann ist der Aufschluß im Bombenrohr mit rauchender Salpetersäure angezeigt.

Anwesendes Arsen wird bei diesem Aufschluß in Arsensäure übergeführt. Um es neben Phosphorsäure zu erkennen, scheidet man es durch Schwefelwasserstoff als Sulfid ab (vorheriges Vertreiben der Salpetersäure), löst letzteres in Salpetersäure auf und fällt als Ammoniummagnesiumarsenat aus.

Pflanzliches und tierisches Material kann man auch mit Kaliumchlorat und Salzsäure (20 g Kaliumchlorat auf 100 g konzentrierte Salzsäure) durch Erhitzen am Steigrohr zerstören und vollständig oxydieren. Arsen und Phosphor liegen am Ende als die entsprechenden Säuren vor.

Was den Nachweis sonstiger Elemente anlangt, die nicht zu leicht flüchtig sind, so stellt man sich nach den dafür an anderer Stelle entwickelten Regeln zunächst eine „Asche“ her, in der man nach den Methoden der anorganischen Analyse auf die einzelnen Bestandteile fahndet.

## II. Quantitative organische Elementaranalyse.

### 1. Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff nach LIEBIG.

Das Verfahren, dem J. v. LIEBIG schon im Jahre 1831 eine sehr zweckmäßige Ausführungsform gegeben hat, besteht darin, eine ihrer qualitativen Zusammensetzung nach bekannte Substanz in abgewogener Menge mit Hilfe von Oxydationsmitteln — Kupferoxyd (GAY LUSSAC, DÖBEREINER, 1815), Bleichromat

<sup>1</sup> Anwesender Schwefel wird dabei in Alkalisulfid übergeführt, das mit Silbernitrat schwarzes Silbersulfid liefert; wollte man hier auf Halogen prüfen, dann müßte zunächst der Schwefelwasserstoff vertrieben werden.

(LIEBIG, 1837), Mangandioxyd, bei Anwesenheit von Halogen mit Bleidioxyd vermischt (H. TER MEULEN und J. HESLINGA<sup>1</sup>) — vollständig zu verbrennen. Die gebildeten Produkte, Kohlendioxyd und Wasser, werden in geeigneten Absorptionsapparaten aufgefangen und zur Wägung gebracht. Man führt die Verbrennung entweder im offenen Rohre im Sauerstoff- oder Luftstrom, seltener auch im einseitig geschlossenen Rohre (Bajonettrohr) aus.

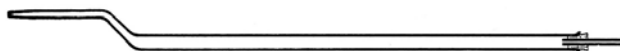


Abb. 1. Bajonettförmiges Verbrennungsrohr.

α) Verbrennungsrohre. Die beiderseitig offenen Rohre sind aus schwer schmelzbarem Glase oder wohl auch aus Quarz hergestellt. Die lichte Weite beträgt etwa 1,5 cm. Die Länge (rund 90 cm) ist so zu bemessen, daß das Rohr auf jeder Seite des Verbrennungsofens etwa 7 cm herausragt. Daneben benutzt man auch die schon erwähnten, etwa 75 cm langen Bajonettrohre (Abb. 1.).

β) Absorptionsgefäße für Wasser. Hierzu dienen vielfach U-förmige Rohre (Abb. 2). Die an dem einen Seitenstück angebrachte kugelige Erweiterung hat den Zweck, die Hauptmenge des bei der Verbrennung entstehenden Wassers in flüssiger Form aufzunehmen, um es vom Calciumchlorid fernzuhalten und dadurch die Gebrauchsdauer des Rohres zu verlängern; nach der Wägung entfernt man dieses Wasser durch Ausschleudern.

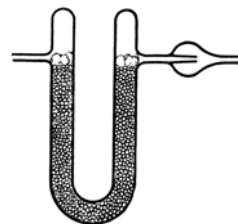


Abb. 2. U-förmiges Chlorcalciumrohr.

Man füllt das U-Rohr mit ausgesiebttem, gekörntem, durch Trocknen bei 150° (im Luftbad; Vorsicht, nicht zu stark erhitzen!) wasserfrei gemachtem Chlorcalcium und bedeckt mit etwas Glaswolle. Dann werden die beiden Rohrenden zugeschmolzen. Da solche Rohre, die zuverlässig dicht sind, bei Erschöpfung der Calciumchloridfüllung kaum mehr als einmal neu beschickt werden können, benutzt man wohl auch U-Rohre, die nur einseitig (bei der kugeligen Erweiterung) zugeschmolzen sind, auf der andern Seite aber mittels eines Gummistopfens verschlossen werden. Calciumchlorid enthält meist basische Bestandteile. Daher ist vor dem erstmaligen Gebrauch des U-Rohres etwa 1/2 Stunde lang ein lebhafter Strom von Kohlendioxyd durchzuleiten; zweckmäßig läßt man das Calciumchloridrohr anschließend, einseitig verschlossen, über Nacht unter dem Druck des Kipp-Apparates stehen. Das Chlorcalciumrohr, aus dem man das Kohlendioxyd durch Luft verdrängt hat, wird mit Verschlußkappen aufbewahrt.

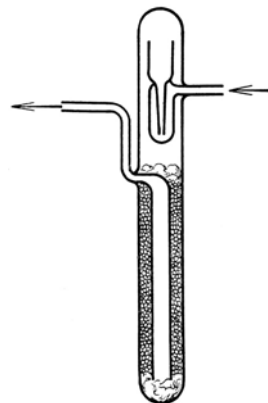


Abb. 3. Gerades Chlorcalciumrohr.

Um der Zerbrechlichkeit der U-förmigen Absorptionsrohre, die zum Aufhängen an der Waage mit einem Aluminiumdraht versehen sind, zu entgegen, hat man andere Formen entwickelt. Erwähnt sei hier nur die Ausführung der Firma Dr. Bender & Dr. Hobein in München (Abb. 3). Ihre Wirkungsweise dürfte nach der Abbildung ohne weiteres verständlich sein. Der Apparat wird, um die Chlorcalciumfüllung erneuern zu können, auch mit abnehmbarer, angeschliffener Bodenkappe geliefert.

<sup>1</sup> H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1927.

γ) Absorptionsgefäße für Kohlendioxyd. Der zerbrechliche, von LIEBIG angegebene „Kaliapparat“ (Abb. 4) ist durch neuere Ausführungen fast vollständig verdrängt worden. Hier mögen nur zwei bewährte Formen erwähnt werden, der „Schraubenapparat“ von Greiner & Friedrichs (Abb. 5a) sowie der Kugelapparat nach Dr. Bender & Dr. Hobein (Abb. 5b). Bei ersterem muß das eingeleitete Kohlendioxyd längs der Spirale durch die Kalilauge hindurchgehen (langer Weg!), bei letzterem ist ein dreimaliges Hindurchperlen durch die Lauge erzwungen. Die auf die Kaliapparate aufgeschliffenen kleinen Röhrchen werden, um das Entweichen von Wasser zu verhindern, mit gekörntem Chlorcalcium gefüllt, das durch einen Bausch von Glaswolle am Herausfallen verhindert wird, und dicht auf den leicht eingefetteten

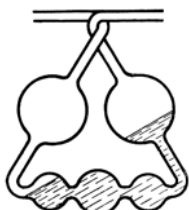


Abb. 4. Kaliapparat nach LIEBIG.

Schliff aufgesetzt; Erneuerung der Füllung nach etwa 6—8 Verbrennungen.

Der Kaliapparat wird mit einer etwa 50%igen Kalilauge beschickt; das benutzte Kaliumhydroxyd soll nicht mit Alkohol gereinigt sein. Der Inhalt reicht meist für zwei Verbrennungen aus. Man füllt den Apparat, indem man das aufgeschliffene Chlorcalciumröhrchen abnimmt und mittels eines angeschlossenen Gummischlauches ansaugt, während das andere Rohrende in Kalilauge taucht. Der Kaliapparat wird beim Aufbewahren mit Gummiverschlußkappen versehen.

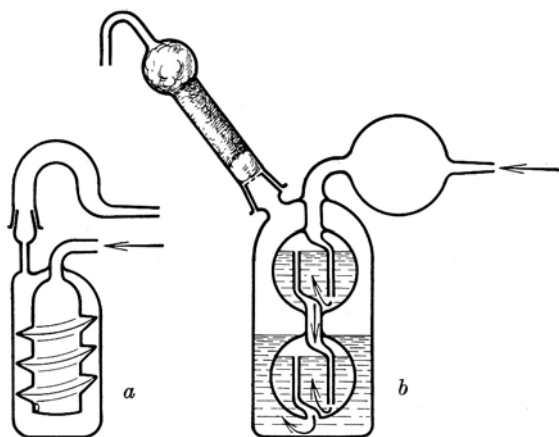


Abb. 5. Kaliapparate.

δ) Trockenapparate. Die bei der Verbrennung benötigten Gase (Sauerstoff, Luft) müssen frei von Kohlendioxyd und Feuchtigkeit sein. Zu diesem Zwecke leitet man sie, bevor

sie in das Verbrennungsrohr eintreten, durch eine Wasch- und Trockenröhrenanordnung, die der Reihe nach mit Kalilauge (50%ig), Chlorcalcium und konzentrierter Schwefelsäure beschickt ist. Mit Hilfe eines Dreiwegrohres sowie

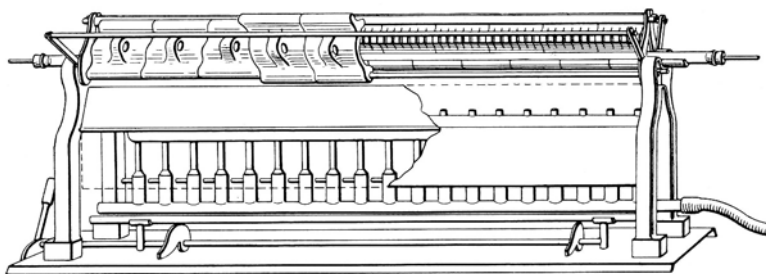


Abb. 6. Verbrennungsofen.

von Glashähnen können dem Trockenapparat Luft und Sauerstoff einzeln oder in Mischung entnommen werden; die Regulierung erfolgt durch Schraubenquetschhähne. Käuflicher Sauerstoff, der mitunter etwas Wasserstoff enthält,

wird davon befreit, indem man das Gas über glühendes Kupferoxyd leitet. Luft bzw. Sauerstoff werden geeigneten Gasometern entnommen.

ε) Verbrennungsöfen. Man kennt Ausführungen nach GLASER, ERLÉNMEYER, VOLHARD, ANSCHÜTZ usw. Ein gangbarer Ofen ist in Abb. 6 dargestellt. Bewährt haben sich auch der tragbare abgekürzte Ofen mit Gasheizung nach VON WALTHER sowie gewisse elektrische Verbrennungsöfen, z. B. das Modell der Firma W. C. Heraeus<sup>1</sup>.

#### a) Verbrennung bei ausschließlicher Anwesenheit von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff.

In das gereinigte, trockne, an den Kanten rund geschmolzene Verbrennungrohr schiebt man eine federnde Spirale aus Kupferdrahtnetz (2 cm lang) soweit ein, daß ein Rand von etwa 8 cm bleibt. Mit Hilfe eines weiten Trichters füllt



Abb. 7. Beschicktes Verbrennungrohr.

man darauf vom andern Ende her eine etwa 50 cm lange Schicht von Kupferoxyd in Stäbchen- bzw. Drahtform; durch Klopfen mit der Hand sorgt man für eine enge Schichtung. Nach der inneren Seite des Rohres hin wird die Kupferoxydbeschickung wieder durch eine an der Glaswandung federnde Kupferspirale (2 cm lang) abgeschlossen. Auf einen frei bleibenden Raum von etwa 10 cm, bestimmt für das Verbrennungsschiffchen, folgt eine etwa 10 cm lange Spirale aus Kupferdrahtnetz. Der Rand nach außen soll wieder 8 cm breit sein (Abb. 7). Mittels eines Gummistopfens wird, wie Abb. 7 zeigt, ein kurzes Hahnrohr eingesetzt. An dieses schließt sich ein gerades Calciumchloridrohr an, das seinerseits durch einen mit Schraubhahn versehenen nahtlosen Gummischlauch über den Trockenapparat mit den Gasometern in Verbindung steht.

Das auf einer Schicht Asbestpapier oder auf Schamotteschalen in der Eisenrinne des Verbrennungsofens liegende Rohr wird im Sauerstoffstrom bei geschlossenen Kacheln allmählich auf Rotglut gebracht und solange erhitzt, bis am offenen Ende Kondenswasser<sup>2</sup> nicht mehr auftritt und Sauerstoff nachweisbar ist (Aufflammen eines glimmenden Holzspans). Dann verschließt man durch einen Gummistopfen mit geradem Chlorcalciumrohr. Nach 15 Minuten stellt man, durch den Schraubhahn reguliert, auf Luft um, dreht die Flammen unter der linken Hälfte des Rohres (Abb. 7) sowie zwei Flammen unter der Spirale am rechten Ende aus und läßt (Kacheln auch zurückschlagen) erkalten, während in der rechten Hälfte weiter erhitzt wird. In dieser Zeit wägt man Untersuchungssubstanz und Absorptionsgefäße ab.

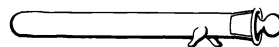


Abb. 8. Wägeröhrchen.

Untersuchungssubstanz. Die „analysenreine“ Substanz wird sehr fein gepulvert und im Vakuum-Exsiccator, gefüllt mit konzentrierter Schwefelsäure oder mit Phosphor-pentoxyd, durch mindestens 6stündiges Trocknen (Gewichtskonstanz) von anhaftender Feuchtigkeit befreit. Säureempfindliche Stoffe trocknet man besser über Chlorcalcium, hochschmelzende, wärmebeständige Stoffe im Luftbad bis zu 110°. Flüssigkeiten bewahrt man im nicht evakuierten Exsiccator auf. Substanzen, die Krystallflüssigkeiten enthalten, trocknet man im Hochvakuum bei erhöhter Temperatur (Trockenpistole).

Die Substanz wird im konstant geglühten Schiffchen aus Porzellan oder Platin (Kontaktwirkung) oder auch in einem Wägeröhrchen (Abb. 8) genau abgewogen (0,1 bis 0,2 g)

<sup>1</sup> W. C. HERAEUS: Pharmaz. Ztg. 1909, 50, 218.

<sup>2</sup> Die Abkühlung des Rohres an den beiden Enden des Ofens verhindert man durch Auflegen je eines Asbestreiters mit entsprechendem Ausschnitt; dadurch wird gleichzeitig das Anbrennen der Gummistopfen hintangehalten.

und dann im Exsiccator verwahrt. Schwer verbrennbare Stoffe werden im Schiffchen mit ausgeglühtem Kupferoxydpulver vermischt.

Flüssigkeiten wägt man in selbst hergestellten Glaskügelchen mit nicht zu enger Capillare ab. Das Kügelchen muß, im Schiffchen mit der Capillare der Kupferoxydschicht zugewandt liegend, in das Verbrennungsrohr eingeschoben werden können. Man füllt es folgendermaßen:

Das getrocknete und gewogene Glaskügelchen taucht man mit der Spitze der Capillare in die Untersuchungsflüssigkeit, die sich in einem im Exsiccator stehenden Gefäß befindet. Beim Evakuieren entweicht die Luft auch aus dem Kügelchen. Läßt man nun wieder Luft in den Exsiccator einströmen, so füllt sich das Glaskügelchen mit der Flüssigkeit. Durch Veränderung des Vakuums kann man die aufgesaugte Menge regeln. Man verdampft die Flüssigkeit aus der Capillare mit kleiner Flamme, reinigt und bringt nach dem Erkalten zur Wägung.

Bei Flüssigkeiten, die mit kohligem Rückstand verbrennen, muß das Kügelchen im Rohr zertrümmert werden. Man füllt zunächst eine etwa 3 cm lange Schicht feines ausgeglühtes Kupferoxydpulver in das Rohr und läßt dann das Kügelchen, Capillare voran, hinterher gleiten. Bei schräg gehaltenem Rohr zerdrückt man es mit der Spirale aus Kupferdrahtnetz. Sehr schwer flüchtige Flüssigkeiten können unmittelbar im Schiffchen abgewogen und verbrannt werden.

Absorptionsgefäße. Als Regel ist zu beachten, daß die Apparate nach dem Abreiben mit einem Lappen<sup>1</sup> mindestens 1 Stunde vor der Wägung im Wägezimmer stehen. Sie werden nach Abnahme der Gummiverschlüsse und der Fußgestelle gewogen.

Mittlerweile ist die linke Hälfte des Verbrennungsrohres abgekühlt. Man stellt den Luftstrom ab, öffnet, zieht die lange Kupferspirale mit einem Draht-haken heraus, schiebt das Schiffchen rasch ein, die Spirale hinterher und setzt den Stopfen mit dem Hahnrohr wieder dicht ein.

Am andern Ende werden die Absorptionsgefäße angeschlossen. Nach Herausnahme des geraden Chlorcalciumrohres setzt man einen Gummistopfen ein und führt durch dessen Bohrung das gewogene Chlorcalciumrohr, dessen Wasser-sack dem Verbrennungsrohr zugekehrt ist. Mittels eines nahtlosen dickwandigen Gummischlauches wird der Kaliapparat in der Weise angeschlossen, daß sich die seitlichen Rohre der beiden Absorptionsgefäße Glas an Glas berühren<sup>2</sup>. Hinter dem Kaliapparat hängt man sicherheitshalber noch ein nicht gewogenes Chlorcalciumrohr an.

Dichtigkeit der Apparatur. Man verschließt das Chlorcalciumröhrchen des Kaliapparates mit der Verschußkappe und öffnet den zum Luftgasometer führenden Hahn. Wenn der Druck ausgeglichen ist, darf mehrere Minuten lang keine Gasblase in der Waschflasche des Trockenapparates auftreten. Schließt man nun den Hahn, dann äußert sich eine Undichtigkeit in einer Niveauänderung im Kaliapparat. Die undichte Stelle liegt meist beim Verbindungsschlauch oder bei der Verschußkappe.

Die eigentliche Verbrennung erfolgt entweder bei geschlossenem Hahn oder im langsamen Sauerstoffstrom. Bei schwer verbrennbaren Substanzen bzw. solchen, die schwer verbrennbare Zersetzungsprodukte liefern, ist letztere Methode vorzuziehen, bei leicht flüchtigen Stoffen aber die Verbrennung im geschlossenen Apparat.

Man zündet bei langsamem Sauerstoffstrom (in 2 Sekunden im Kaliapparat eine Gasblase) die Brenner unter der vorderen langen sowie der am andern Ende befindlichen kurzen Spirale an und erhitzt bei geschlossenen Kacheln innerhalb 20—30 Minuten allmählich auf dunkle Rotglut. Die Asbestreiter an den beiden Rohrenden sind aufgesetzt. Nun schließt man die Kacheln auch beim Schiffchen und erreicht dadurch ein vorsichtiges Vorwärmen. Erst dann werden, von beiden Seiten auf das Schiffchen zukommend, die darunter befindlichen Brenner unter sehr vorsichtiger Vergrößerung der Flammen entzündet. Das zulässige Fortschreiten in der Temperatursteigerung wird durch die

<sup>1</sup> Zur Steigerung der Genauigkeit soll man zuerst mit einem leicht feuchten Flanell-läppchen und dann mit einem trocknen Rehleder abreiben.

<sup>2</sup> Die Reibung zwischen Gummi und Glas verringert man, indem man mehrfach durch die Bohrungen der Stopfen und der Schläuche hindurchbläst.

Beobachtung der Blasenfolge im Kaliapparat festgestellt; die Blasen dürfen nur in zählbarer Reihenfolge entweichen. Ist die Verbrennung im Gange, so nimmt die Blasenanzahl zu; außerdem macht sich an dem aus dem Ofen herausragenden kalten Teile des Rohres Abscheidung von Kondenswasser bemerkbar.

Ist bei geschlossenen Kacheln das ganze Rohr auf Rotglut erhitzt und läßt die Kohlendioxydentwicklung nach, dann verstärkt man den Sauerstoffstrom etwas, um die Verbrennung und das Übertreiben der Oxydationsprodukte zu vollenden. Dabei kann das Auftreten von Gasblasen im Kaliapparat mitunter ganz aufhören, weil das durch Reduktion entstandene metallische Kupfer wieder ins Oxyd übergeführt wird. Man muß daher den Sauerstoffstrom etwas verstärken und darf ihn erst bei wieder einsetzender rascherer Blasenfolge verlangsamen.

Sobald sich Sauerstoff hinter den Absorptionsgefäßen nachweisen läßt, schaltet man, um ihn aus der Apparatur zu verdrängen, auf Zufuhr von Luft um. Während des langsamen, 10 Minuten langen Durchleitens der Luft (zwei Blasen in der Sekunde) werden die Flammen allmählich verkleinert und schließlich gelöscht. Das am Ende des Rohres kondensierte Wasser treibt man durch Heranhalten einer heißen Kachel vollständig in das Chlorcalciumrohr über.



Abb. 9. Beschickung des Verbrennungsrohres beim Mischen der Substanz mit Kupferoxyd.

Nun löst man zunächst den Kaliapparat ab, dann das Chlorcalciumrohr, versieht beide mit ihren Verschlußkappen und bringt sie zum Temperatenausgleich in das Wägezimmer. Nach Ablauf einer Stunde wägt man unter den gegebenen Vorichtsmaßregeln.

Das Verbrennungsrohr bleibt im Ofen liegen, wird aber nach außen durch ein gerades Chlorcalciumrohr abgeschlossen. Es ist für die nächste Bestimmung bereit.

Berechnung der Ergebnisse. Der Prozentgehalt der Untersuchungssubstanz an Kohlen- und Wasserstoff läßt sich nach folgenden Formeln berechnen:

$$\text{Prozent Kohlenstoff} = \frac{\text{Gewogenes Kohlendioxyd}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 27,27,$$

$$\text{Prozent Wasserstoff} = \frac{\text{Gewogenes Wasser}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 11,19.$$

Für Kohlenstoff kann man mit einem Fehler von  $\pm 0,3\%$ , für Wasserstoff mit einem solchen von  $0,3\%$  nach oben und  $0,1\%$  nach unten rechnen. Exakte Bestimmungen ergeben meist etwa  $0,1\%$  Wasserstoff zu viel und  $0,1\%$  Kohlenstoff zu wenig.

Verbrennung der mit gepulvertem Kupferoxyd gemischten Substanz. Bei schwer verbrennbaren Stoffen oder solchen, die sich beim Erwärmen rasch oder explosionsähnlich zersetzen, ist die Verbrennung im Schiffchen nicht anwendbar. Man mischt dann die Substanz mit feinem, ausgeglühtem Kupferoxyd.

Die Beschickung des Verbrennungsrohres ist in Abb. 9 schematisch dargestellt. An die Stelle des Schiffchens tritt die Mischung der Substanz mit Kupferoxydpulver.

Ein trockenes Wägegläschen — die Öffnung muß sich in das Mischrohr einführen lassen — wird mit  $0,1$  bis  $0,2$  g Substanz genau gewogen und dann in ein mit Glasschliffstopfen versehenes Mischrohr — die Öffnung muß sich in das Verbrennungsrohr einführen lassen — entleert, das einige Zentimeter hoch mit

ausgeglühtem Kupferoxyd<sup>1</sup> gefüllt ist. Durch Zurückwägen des Gläschens erfährt man die Menge der angewandten Substanz.

Man überschichtet mit Kupferoxyd und schüttelt nach Aufsetzen des Glasstopfens gut durch. Der Inhalt wird dann verlustlos in das Verbrennungsrohr gegeben. Man spült das Mischrohr 4—5mal mit Kupferoxyd nach. Beim Einfüllen einer jeden Portion in das Verbrennungsrohr wird dessen Wandung ebenfalls damit durchgespült. Als Abschluß setzt man die 2 cm lange Kupferspirale wieder auf und schließt an die Trockenapparatur wie vorher an.

Die Verbrennung vollzieht sich ähnlich wie schon beschrieben, erfordert aber meist eine etwas längere Versuchsdauer. Dies ist dadurch bedingt, daß man das beschickte Rohr vor Zugabe der Substanz etwa 15 Minuten lang durch Ausglühen im Luftstrom trocknen muß; erst nach dem Erkalten kann man das Gemisch aus Substanz und Kupferoxyd einfüllen und die Absorptionsapparate anschließen. Bei dieser Art der Verbrennung können etwa verbleibende Rückstände kohlgiger oder anorganischer Natur nicht erkannt werden.

Verbrennung im Bajonettrohr. Die eben beschriebenen Arten der Verbrennung im offenen Rohre haben die Arbeitsweise mit dem geschlossenen sog. Bajonettrohr (vgl. Abb. 1) fast ganz verdrängt. Es erübrigt sich, darauf einzugehen.

#### b) Verbrennung bei Gegenwart von Stickstoff.

Beim Vorliegen von stickstoffhaltigen Substanzen ist bei der Verbrennung mit der Bildung von Stickoxyden zu rechnen, die im Kaliapparat absorbiert und Kohlendioxyd vortauschen würden. Sie müssen daher zu Stickstoff reduziert werden, der durch die Absorptionsgefäße ungehindert hindurchgeht. Man bewerkstelligt dies mit blanken Spiralen aus Kupferdrahtnetz, die an das Ende des Verbrennungsrohres, den Absorptionsgefäßen zunächst, eingeschoben werden.

Reduzierte Kupferspiralen. Die in der Gebläseflamme zum Glühen erhitzte Spirale läßt man in ein dickwandiges Reagensglas gleiten, das mit 1 ccm Methylalkohol beschickt ist und am Boden einen Bausch Glaswolle besitzt. Es erfolgt augenblicklich Reduktion. Nach dem Verlöschen der auftretenden Methylalkoholflamme setzt man auf das Reagensglas einen Gummistopfen mit Hahnrohr auf, evakuiert an der Wasserstrahlpumpe unter Erhitzen mit einem kräftigen Brenner (10 Minuten), bis Feuchtigkeit nicht mehr wahrgenommen wird (Gummistopfen nicht verbrennen!). Man läßt im Vakuum erkalten.

Stickstoffhaltige Substanzen sind meist schwer verbrennlich. Man zersetzt sie daher am besten in Mischung mit Kupferoxyd. Will man aber im Schiffchen verbrennen, dann ist die Überschichtung der Substanz mit Kupferoxyd immer angezeigt. Bei stickstoffreichen Nitroverbindungen reicht eine reduzierte Spirale nicht aus; man wendet deshalb meist deren zwei von je 10 cm Länge an.

Das ohne Substanz und reduzierte Spiralen durch Erhitzen im Luftstrom<sup>2</sup> getrocknete Rohr wird nach dem Erkalten mit der Analysesubstanz sowie den beiden reduzierten Kupferspiralen beschickt. Die eigentliche Verbrennung erfolgt im abgeschlossenen Rohr, wobei die Spiralen auf helle Rotglut erhitzt werden. Ein Zurücksteigen der Flüssigkeit aus dem Kaliapparat muß man durch Zutretenlassen von etwas Luft aus dem Gasometer hintanhaltend. Gegen Ende der Verbrennung leitet man Sauerstoff ein, nachdem man die Flammen unter den reduzierten Spiralen gelöscht hat. Das Ende des Versuches ist am Auftreten von Sauerstoff hinter dem Kaliapparat feststellbar. Sonstige Operationen und Berechnungen erfolgen wie früher beschrieben.

<sup>1</sup> Das ausgeglühte feine Kupferoxyd bewahrt man in einer weithalsigen, mit geradem Chlorcalciumrohr versehenen Birne auf; zum Umfüllen dient ein entsprechend weiter Kupfertrichter oder ein Glastrichter mit abgesprengtem Hals.

<sup>2</sup> Will man mit Sauerstoff arbeiten, so muß dieser vor der Verbrennung wieder durch Luft verdrängt werden, da sonst die reduzierten Spiralen zu rasch oxydiert würden.

### c) Verbrennung bei Gegenwart von Halogenen oder Schwefel.

Bei der Verbrennung von halogen- oder schwefelhaltigen Substanzen entstehen Schwefeldioxyd bzw. Kupferhalogenid. Das Cuprohalogenid ist bei Rotglut ziemlich flüchtig und würde sich am Ende des Rohres, möglicherweise sogar im Chlorcalciumrohr niederschlagen, hier die Wägung des Wassers störend, während das Schwefeldioxyd, im Kaliapparat absorbiert, Kohlendioxyd vortauschen würde. Um diese Störungen zu überwinden, wird das Kupferoxyd bei der Verbrennung zur Hälfte (nach der Seite der Absorptionsgefäße zu) durch eine etwa 20 cm lange Schicht von Bleichromat ersetzt. Dieses hält Halogen und Schwefel bzw. Sulfat zurück, darf aber nicht zu hoch erhitzt werden. Wenn in der Analysesubstanz außerdem noch Stickstoff enthalten ist, dann werden zwischen Kupferoxyd- und Bleichromatschicht eine oder zwei reduzierte Kupferspiralen eingeschoben.

Halogenhaltige Verbindungen lassen sich auch mit Kupferoxyd verbrennen, wenn man am Ende des Rohres eine blanke Silberspirale, eine versilberte Kupferspirale oder ein Schiffchen mit fein gepulvertem Silber zur Bindung des Halogens einführt.

### d) Verbrennung bei Gegenwart von Alkali und Erdalkali.

Wenn Alkali- oder Erdalkalimetalle anwesend sind, entsteht bei der Verbrennung ganz oder teilweise glühbeständiges Carbonat; hierdurch kommt ein Fehlbetrag an Kohlendioxyd zustande. Die Zersetzung dieser Carbonate erreicht man dadurch, daß man die Substanz im Schiffchen<sup>1</sup> mit einer nicht zu knapp bemessenen Menge von fein gepulvertem, durch vorheriges Schmelzen getrocknetem Kaliumdichromat überschichtet. Die Verbrennung wird wie sonst durchgeführt.

## 2. Bestimmung des Stickstoffes.

Von ungleich größerer Bedeutung als die Ermittlung der andern Elemente ist für den Lebensmittelchemiker die quantitative Erfassung des Stickstoffes. Sind doch, um ein Beispiel herauszugreifen, die so gewonnenen Ergebnisse in vielen Fällen die rechnerische Grundlage<sup>2</sup> für die zahlenmäßige Angabe des Gehaltes einer Substanz an Eiweiß und damit deren Beurteilung.

Es sind vor allem 4 Methoden, die analytisch entwickelt und in die Praxis eingeführt worden sind, die Verfahren nach J. KJELDAHL, nach J. B. DUMAS, nach WILL-VARRENTTRAPP und nach H. TER MEULEN und J. HESLINGA. Die Bestimmung nach J. B. DUMAS ist allgemein anwendbar; sie wird daher bei wissenschaftlichen Untersuchungen bevorzugt. Die Arbeitsweise nach J. KJELDAHL stellt demgegenüber wegen der relativen Einfachheit der Durchführung sowie der Sicherheit der Ergebnisse das vor allem für die lebensmittelchemische Praxis und die hier oft erforderlichen Serienuntersuchungen geeignete Verfahren dar.

### a) Verfahren nach J. KJELDAHL<sup>3</sup>.

Das Verfahren beruht darauf, daß der Stickstoff in organischen Verbindungen durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure bei Gegenwart von sauerstoffübertragenden und unter Umständen auch von reduzierenden Mitteln

<sup>1</sup> Verbrennung der Substanz im Gemisch mit Kupferoxyd ist hier nicht angängig, wie ohne weiteres einleuchtet.

<sup>2</sup> Es sei darauf hingewiesen, daß für die Umrechnung des Stickstoffgehaltes von Lebensmitteln und Futtermitteln in das Eiweiß dieser Produkte von D. B. JONES neuerdings exakte Faktoren angegeben worden sind in United States Department of Agriculture, Washington, D. C., Circular Nr. 183, August 1931.

<sup>3</sup> J. KJELDAHL: Zeitschr. analyt. Chem. 1883, **22**, 366.



vollständig in Ammoniumsulfat übergeführt wird. Durch Destillation mit überschüssiger Alkalilauge wird das in Freiheit gesetzte Ammoniak übergetrieben, in vorgelegter gemessener Säure aufgefangen und dann bestimmt.

Das Verfahren von J. KJELDAHL ist oft nachgeprüft worden und hat im Laufe der Jahre, ohne im Prinzip verändert zu werden, mannigfache Umgestaltungen und Verbesserungen<sup>1</sup> erfahren, von deren Aufzählung im einzelnen Abstand genommen werden soll.

a) Vorbereitung und Abwägung der Substanz<sup>2</sup>. Sie braucht für den Aufschluß nur so weit zerkleinert zu werden, daß man nach dem Mischen eine Durchschnittsprobe entnehmen kann. Bei Stoffen mit einem Stickstoffgehalt über 5% wägt man etwa 0,5 g ab, mit einem solchen von etwa 1% 1,5—2 g. Von breiartigen Stoffen werden je nach dem Stickstoffgehalt 2—5 g (entsprechend 1—2 g Trockensubstanz) abgewogen. Hierzu bedient man sich kleiner Glasbecher<sup>3</sup> oder Behältnisse, die aus einer ein- oder mehrfachen Schicht von Stanniol geformt sind; pastenförmige Stoffe können mit Vorteil auch auf Deckgläschen, wie sie beim Mikroskopieren verwendet werden, abgewogen werden. Die Abwägegefäße bringt man samt Inhalt in den Zerstörungskolben.

Von Flüssigkeiten, die reich an Stickstoff sind (z. B. Milch) werden 10—30 g, von solchen mit weniger Stickstoff 30—100 g und schließlich von sehr stickstoffarmen Produkten 100—500 g in Arbeit genommen. Die Mengenbestimmung erfolgt bei den in kleiner Einwaage anzuwendenden Flüssigkeiten in der Weise, daß man aus einem mit Glasstab und Inhalt tarierten Glasgefäß unter Benutzung des Glasstabes die erforderliche Menge in den Zerstörungskolben gibt und dann zurückwägt. Größere Flüssigkeitsmengen können auch volumetrisch abgemessen werden (mit dem Spezifischen Gewicht auf Gewicht umrechnen). Beim Vorhandensein einer größeren empfindlichen Waage ist auch unmittelbare Wägung möglich.

Die in den Zersetzungskolben eingewogenen Flüssigkeiten werden bei schwach schwefelsaurer Reaktion (damit kein Ammoniak entweicht) auf etwa 10—20 ccm eingedampft, ohne daß ein Anbrennen der Substanz an der Kolbenwandung erfolgt; hierbei kann das Aufblasen eines warmen, ammoniakfreien Luftstromes (Föhnapparat) oder das Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe bei gleichzeitigem Erwärmen des Gutes auf dem erhitzten Wasserbad sehr beschleunigend wirken. Nach dem Erkalten setzt man die Schwefelsäure zu, indem man damit die am Halse hängengebliebenen Teile der Untersuchungssubstanz unter Schräghalten des Kolbens sorgfältig herunterspült.

β) Aufschluß der Substanz. Um bei der späteren Destillation das lästige Aufschließen zu vermeiden, verwendet man als Aufschlußkolben (sog. KJELDAHL-Kolben) solche mit einem Fassungsvermögen von 500—600 ccm, hergestellt aus schwer schmelzbarem, widerstandsfähigem Glas, z. B. Jenaer Gerätéglass 20 oder Duranglas (Schott & Gen., Jena). Es gibt Formen mit langem und mit kürzerem Hals; die Kolben sind neuerdings nach Din Denog Formblatt 7 genormt.

Zur Zerstörung der Analysesubstanz wird konzentrierte Schwefelsäure benutzt, zu der man nach mannigfachen Vorschlägen Zusätze<sup>4</sup> von einheitlichen

<sup>1</sup> Zur Unterrichtung sei auf folgende neuere Arbeiten hingewiesen: Ref. Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 79, 63. — A. C. ANDERSON u. B. N. JENSEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1925/26, 67, 427. — K. KÜRSCHNER u. K. SCHARRE: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 68, 1. — Stickstoff in Düngemitteln. Ref. Zeitschr. analyt. Chem. 1931, 84, 389. — E. SCHULEK u. G. VASTAGH: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 92, 352.

<sup>2</sup> Vielfach ist es in der Praxis üblich, um eine zuverlässige Durchschnittsprobe zu erhalten, eine relativ große Menge des Ausgangsmaterials zu zersetzen und vom Aufschluß nur einen aliquoten Anteil zur Ammoniakdestillation zu verwenden.

<sup>3</sup> Man erweicht den Boden eines Reagensglases in der Flamme und drückt ihn flach. Hierauf sprengt man den unteren Teil als Wägebecher ab.

<sup>4</sup> Eine Zusammenstellung darüber vgl. bei K. KÜRSCHNER: Festschrift der Deutschen Technischen Hochschule in Brünn zur Feier ihres 75jährigen Bestehens im Mai 1924, S. 253.

Stoffen oder von Stoffgemischen geben kann. Neben der gewöhnlichen konzentrierten Schwefelsäure benutzt man Gemische mit rauchender Schwefelsäure. Als Oxydationsbeschleuniger werden z. B. Phosphorpentoxyd, Kupferoxyd, Kupfersulfat, Quecksilber zugesetzt, und zur Erhöhung des Siedepunktes der Schwefelsäure eine ausreichende Menge Kaliumsulfat. Von K. KÜRSCHNER und K. SCHARRER<sup>1</sup> wird auf 0,1 g Substanz die Zugabe von 1 g Kupferpulver, 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure sowie von 10 g Kaliumsulfat empfohlen. In der gleichzeitigen Anwendung von Eisen (Stahlfeilspäne) und Kupferoxydpulver glaubt K. KÜRSCHNER<sup>2</sup> ein allgemein gültiges Verfahren des KJELDAHL-Aufschlusses gefunden zu haben. Nach H. C. MESSMAN<sup>3</sup> ist metallisches Selen sehr geeignet; mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 8 g eines Gemisches aus 90% Natriumsulfat, 7% Mercuriosulfat, 1,5% Cuprisulfat und 1,5% metallischem Selen soll Mehl in 15—20 Minuten restlos aufgeschlossen sein. Von der Stickstofffreiheit dieser Zuschläge überzeugt man sich durch einen Blindversuch<sup>4</sup>.

Bewährt und rasch zum Ziele führend ist der Aufschluß nach A. ATTERBERG:

Die abgewogene Substanz wird mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einem Tropfen (1 g) Quecksilber<sup>5</sup> versetzt; es wird für innige Mischung gesorgt. Während der ersten 15—30 Minuten erwärmt man zunächst gelinde und steigert die Temperatur nur allmählich. Die Flamme soll nicht über den von der Flüssigkeit eingenommenen Teil des Kolbens hinausschlagen. Zu diesem Zwecke wird der Aufschlußkolben entweder auf ein Asbestdrahtnetz oder in eine seiner Wölbung angepaßte Schale aus Eisen gestellt<sup>6</sup>. Als loser Verschuß wird, um Verluste an Schwefelsäure hintanzuhalten, eine gestielte Glaskugel an der Mündung des Kolbenhalses eingelegt (Stiel nach unten).

Wenn die Substanz gelöst ist, wozu je nach ihrer Beschaffenheit verschieden lange Zeiten notwendig sind, gibt man 15—20 g stickstoffreies Kaliumsulfat zu und erhitzt weiter. Nach eingetretener Entfärbung wird das Erhitzen noch 15 Minuten fortgesetzt. Den erkalteten Aufschluß verdünnt man vorsichtig mit etwa 250 ccm Wasser. Soll nur, wie dies häufig der Fall ist, ein aliquoter Teil zur Ammoniakdestillation verwendet werden, dann füllt man nach dem Abkühlen mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen auf. Bei Stoffen, die nicht schäumen, kann das Kaliumsulfat gleich zu Anfang zugegeben werden.

Aufschlußapparate. Für Serienuntersuchungen hat man besondere Apparate für den Aufschluß konstruiert (Abb. 10, *a* u. *b*). Die unter *b* angegebene Anordnung wurde von E. G. HASTINGS, E. B. FRED sowie W. H. PETERSON<sup>7</sup> in der Weise abgeändert, daß das Abzugsrohr aus Blei nach unten gebogen unter Wasser endet. Die entweichenden sauren Dämpfe werden dort absorbiert, wodurch gleichzeitig eine Art Saugwirkung zustande kommt.

γ) Destillation und Bestimmung des Ammoniaks. Der oben beschriebene und mit 250 ccm Wasser verdünnte (gestielte Verschußkugel

<sup>1</sup> K. KÜRSCHNER u. K. SCHARRER: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 68, 1. Das Kupferpulver stellt man durch Reduktion von Kupferoxydpulver mit Methylalkohol in bekannter Weise dar.

<sup>2</sup> K. KÜRSCHNER: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 68, 209.

<sup>3</sup> H. C. MESSMAN: Cereal Chem. 1932, 9, 357; vgl. auch H. E. CROSSLEY: Journ. Soc. chem. Ind. Transact. 1932, 51, 237.

<sup>4</sup> Die derart geprüften Reagenzien reserviert man am besten für die KJELDAHL-Versuche.

<sup>5</sup> Zur schnellen Abmessung des Quecksilbers kann man sich zweckmäßig des WRAMPPELMEYERSchen Hahnes bedienen. Die Firma F. HUGERSHOFF-Leipzig führt für diesen Zweck ein besonders eingerichtetes Meßfläschchen; vgl. R. MEYER: Chem.-Ztg. 1898, 22, 331.

<sup>6</sup> Neuerdings wird auch Erhitzung im Metallbad empfohlen: Legierung aus 1 Teil Blei und 1 Teil Zinn; Schmelzpunkt 210°.

<sup>7</sup> E. G. HASTINGS, E. B. FRED u. W. H. PETERSON: Ind. Engin. Chem. 1927, 19, 397.

nachspülen) Aufschluß wird bei ausreichend großem KJELDAHL-Kolben (sonst umfüllen) mit 80 ccm Natronlauge (33% ig) und 25 ccm Alkalisulfidlösung<sup>1</sup> (das

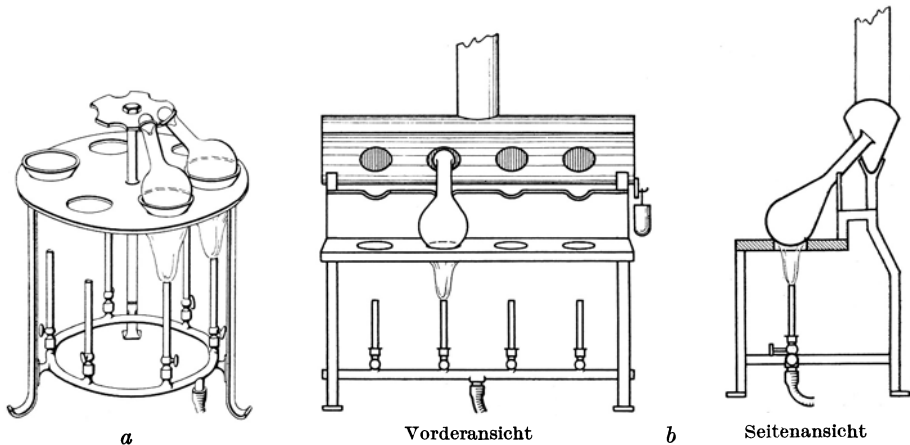


Abb. 10. Aufschlußapparate für Stickstoffbestimmungen nach KJELDAHL.

gesamte Quecksilber muß, da es Ammoniak zurückhalten könnte, ausgefällt werden; den Überschuß des Kaliumsulfids nimmt man mit Kupfersulfatlösung

weg) versetzt. Zum stark alkalischen Gemisch gibt man noch etwas Zink oder Bimssteinpulver (Verminderung des Stoßens) zu und schließt möglichst rasch an die Destillationsapparatur an; in Abbildung 11 ist eine Apparatur für Serienversuche dargestellt. Der Kühler taucht in eine Vorlage, die mit einem gemessenen Überschuß an 0,1 N-Schwefelsäure beschickt ist<sup>2</sup>. Man destilliert unter Verwendung von Sicherheitsaufsätzen<sup>3</sup>, z. B. nach REITMAIR und STUTZER sowie nach C. G. HOPKINS (Abb. 12). Man hat auch Aufsätze empfohlen, die noch einen Tropftrichter besitzen, um die Lauge erst nach der Zusammensetzung der Apparatur zugeben zu können.

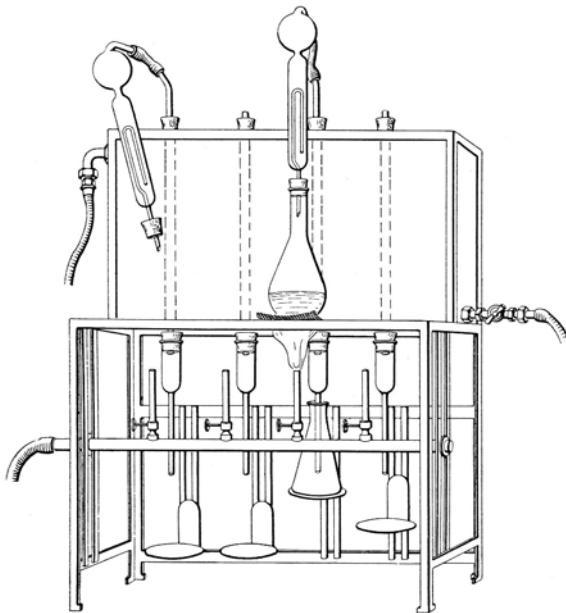


Abb. 11. Destillationsapparatur für Stickstoffbestimmungen nach KJELDAHL.

Wenn etwa 100 ccm Destillat übergegangen sind, braucht das Destillationsrohr nicht mehr einzutauchen. Man erhitzt, bis die Flüssigkeit zu stoßen beginnt; dann ist das Ammoniak vollständig übergetrieben. Nun

<sup>1</sup> 40 g Kaliumsulfid in 1 Liter; auch Natriumthiosulfat sowie phosphorige Säure sind vorgeschlagen worden.

<sup>2</sup> Um immer sicher zu sein, daß die Säure im Überschuß vorhanden ist, färbt man sie mit dem später zu verwendenden Indicator an.

<sup>3</sup> Vg. auch W. LEPPER: Zeitschr. analyt. Chem. 1932, 91, 15.

werden Kühler und Rohr mit Wasser nachgespült. Man titriert mit 0,1 N-Alkalilauge zurück<sup>1</sup>; als Indikatoren eignen sich Methylrot, Kongorot, Methylorange. Durch einen Leerversuch überzeugt man sich zweckmäßig von der Reinheit der angewandten Reagenzien.

Der Verbrauch an 0,1 N-Alkalilauge ergibt durch Multiplikation mit 0,001401 die Stickstoffmenge in Gramm. Man rechnet auf Procente um.

K. KÜRSCHNER und K. SCHARRE<sup>2</sup> empfehlen, das Ammoniak unter gelindem Erwärmen bei kräftigem Durchsaugen von Luft überzutreiben, ähnlich wie dies O. FOLIN<sup>3</sup> schon früher vorgeschlagen hat; K. TÄUFEL und C. WAGNER<sup>4</sup> haben eine zweckmäßige Apparatur für diese Operation angegeben.

Als sehr brauchbar hat sich die Destillationsapparatur nach J. K. PARNAS und R. WAGNER erwiesen (Abb. 13). Man füllt einen aliquoten Teil des Aufschlusses



Abb. 12. Destillations-Sicherheitsaufsatz.

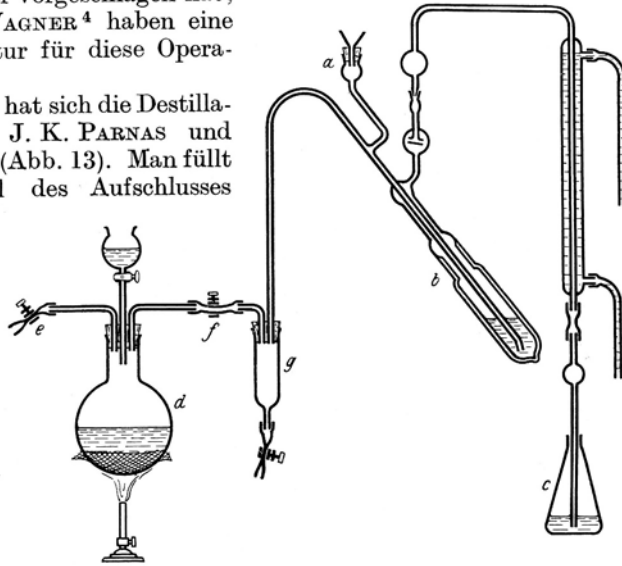


Abb. 13. Destillationsapparatur für Ammoniak nach PARNAS-WAGNER.

mittels Trichters bei *a* in das doppelwandige<sup>5</sup> Gefäß *b* und unterschichtet mit einer ausreichenden überschüssigen Menge Alkalilauge. Dann verschließt man *a* mit einem Gummistopfen, legt bei *c* eine Vorlage mit Säure vor und leitet nun den in *d* entwickelten Wasserdampf durch die Apparatur. Das Sieden bei *b* beginnt sehr rasch und im Verlauf von einigen Minuten ist das Ammoniak übergetrieben. Man entfernt die Vorlage, öffnet den Quetschhahn *e* und schließt denjenigen bei *f*. Der Wassersack *g* wirkt beim Abkühlen als Vakuum und saugt die Reaktionsflüssigkeit aus *b* ab. Man läßt sie abfließen; die Apparatur ist sofort wieder gebrauchsfertig.

δ) Störungen des KJELDAHL-Verfahrens. Wenn in der Analysensubstanz von Stickstoff<sup>6</sup> in Form von Nitraten, Nitriten, von Nitro-, Nitroso-, Azo-, Diazo-, Hydrazo-, Hydrazin-, Pyridin-Verbindungen usw. vorhanden ist,

<sup>1</sup> F. MACH (Landw. Vers.-Stationen 1926, 104, 146) empfiehlt zur Ammoniakbestimmung das von F. P. L. SOERENSEN angegebene Formolverfahren.

<sup>2</sup> K. KÜRSCHNER u. K. SCHARRE: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 68, 1.

<sup>3</sup> O. FOLIN: Zeitschr. physiol. Chem. 1903, 37, 161. — Vgl. auch L. GRÜNHUT: Z. 1919, 37, 304.

<sup>4</sup> K. TÄUFEL u. C. WAGNER: Zeitschr. angew. Chem. 1928, 41, 285.

<sup>5</sup> Zur guten Wärmeisolierung ist der Raum des Doppelmantels evakuiert.

<sup>6</sup> Es handelt sich vor allem um Verbindungen, bei denen der Stickstoff an Sauerstoff oder an ein zweites Stickstoffatom gebunden ist. Der Stickstoff entweicht beim Aufschluß teilweise gasförmig; vgl. hierzu P. FLEURY u. H. LEVALTIER: Bull. Soc. chim. France (4) 1925, 37, 330.

dann wird man unter Umständen fehlerhafte Ergebnisse erhalten. Zur Überwindung dieser Störungen zieht man die Arbeitsverfahren nach JODLBAUR<sup>1</sup> (Zerstören unter Zugabe von Phenolschwefelsäure<sup>2</sup>), nach O. FÖRSTER<sup>3</sup>, nach M. KRÜGER<sup>4</sup> (Reduktion der Nitrate, Nitro- und Nitrosoverbindungen zuerst mit Stannochlorid, dann erst Kjeldahlisierung) sowie JAC. MILBAUER<sup>5</sup> (Reduktion mit Zinkstaub in saurer Lösung) heran. W. LEPPER<sup>6</sup> gibt einen bewährten Aufschluß für Kalkstickstoff an.

Über die Bestimmung des Stickstoffs in Nitraten s. S. 652.

### b) Verfahren nach J. B. DUMAS.

Dieses etwas umständliche, zeitraubende, dafür aber allgemein anwendbare Verfahren ist für die lebensmittelchemische Analytik seit Einführung der KJELDAHL-Methode fast entbehrlich geworden. Da es aber im organisch-chemischen Laboratorium gern benutzt wird, sei es nachstehend kurz beschrieben.

Die Versuchsanordnung sowie die Beschickung des Verbrennungsrohres entsprechen im wesentlichen denjenigen wie bei der Bestimmung von Kohlen- und Wasserstoff bei Anwesenheit von Stickstoff (s. S. 574). Das Trocknen vor dem Versuch ist überflüssig; an Stelle der Absorptionsgefäße wird ein Azotometer angeschlossen.

Das Kupferoxyd im Verbrennungsrohr (ohne Substanz) wird zunächst bei mäßiger Rotglut im Sauerstoffstrom oxydiert. Man läßt erkalten, bringt die abgewogene Substanz mit Kupferoxydpulver gemischt ins Verbrennungsrohr, setzt den Gummistopfen mit Hahnrohr ein und schließt unter Zwischenschaltung einer Waschflasche mit Bleiacetatlösung an den Kipp-Apparat für luftfreies Kohlendioxyd an<sup>7</sup>. Auf der andern Seite schiebt man die beiden reduzierten Spiralen ein und verbindet<sup>8</sup> mit dem mit 50%iger Kalilauge beschickten und durch Quecksilber abgesperrten Azotometer<sup>9</sup>.

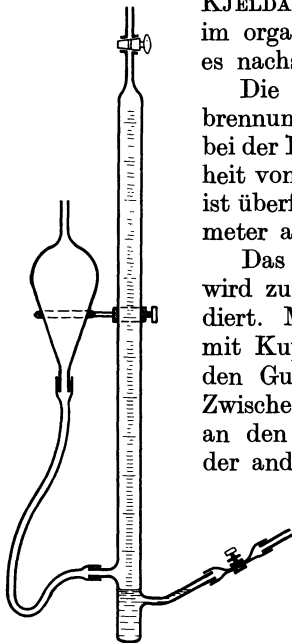


Abb. 14. Azotometer.

Die eigentliche Verbrennung beginnt damit, daß man in bekannter Weise die Luft aus der Apparatur verdrängt (Prüfen!). Ist dies erreicht, dann zündet man nach Abstellen des Kohlendioxydstromes die Flammen unter den reduzierten Spiralen sowie unter

dem Kupferoxyd (aber nicht beim Gemisch aus Substanz und Kupferoxyd) an und bringt auf dunkle Rotglut. Die allmähliche Verbrennung vollzieht sich wie bei der Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff neben Stickstoff (S. 574). Der Stickstoff wird mittels Kohlendioxyds vollständig in das Azotometer<sup>10</sup>

<sup>1</sup> JODLBAUR: Landw. Vers.-Stationen 1888, 35, 447.

<sup>2</sup> Die Reaktion ist wohl die folgende: Phenol → Nitrophenol → Aminophenol → Ammoniumsalz.

<sup>3</sup> O. FÖRSTER: Chem.-Ztg. 1889, 13, 229; 1890, 14, 1673, 1690.

<sup>4</sup> M. KRÜGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, 27, 609, 1633.

<sup>5</sup> JAC. MILBAUER: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 725.

<sup>6</sup> W. LEPPER: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 331.

<sup>7</sup> Vgl. u. a. FR. HEIN: Zeitschr. angew. Chem. 1927, 40, 864.

<sup>8</sup> Die Glasrohre sollen im Verbrennungsrohr nicht mehr als 1 mm aus dem Stopfen herausragen.

<sup>9</sup> Die Dichtigkeit der Apparatur ist bei jedem Versuch nachzuprüfen.

<sup>10</sup> Für Azotometer wird neuerdings eine Normung vorgeschlagen, für die der Din/Denog-Entwurf veröffentlicht ist in Chem. Fabrik 1932, 5, 340.

übergetrieben. Man läßt es dann 1 Stunde lang im Barometerzimmer stehen und hängt daneben (Mitte des Stickstoffvolumens) ein Thermometer auf. Geringe Schaummengen am Meniscus der Lauge sucht man durch Heben und Senken der Birne zu zerstören. Die Ablesung<sup>1</sup> erfolgt bei gleich hoher Stellung des Flüssigkeitsspiegels im Eudiometer und in der Birne; man ermittelt fernerhin gleichzeitig Temperatur und Barometerstand.

Die Berechnung der Analyse<sup>2</sup> kann nach folgender Formel erfolgen:

$$\text{Prozent Stickstoff} = \left( 0,12507 \cdot \frac{1}{1 + \alpha t} \cdot \frac{b - \delta - e}{760} \right) \cdot \frac{V}{s}.$$

|   |  |
|---|--|
| $V$ = abgelesenes Volumen Stickstoff.         | $\alpha = 0,003663.$<br>$b$ = Barometerstand.<br>$\delta$ = Korrektur des Barometerstandes auf $0^{\circ}$ . |
| $s$ = angewandte Substanzmenge.               |  |
| $t$ = Temperatur.                             |  |
| $e$ = Tension der Kalilauge bei $t^{\circ}$ . |  |

Die Fehlergrenze des Verfahrens beträgt etwa 0,3% nach oben und 0,1% nach unten.

### c) Verfahren nach WILL-VARRENTRAPP.

Dieses seit der Einführung der KJELDAHL-Methode nur mehr sehr wenig angewandte Verfahren beruht auf der Tatsache, daß beim starken Erhitzen stickstoffhaltiger Stoffe mit Alkali (Natronkalk) durch den freiwerdenden Wasserstoff der Stickstoff zu Ammoniak reduziert wird. Die Arbeitsweise versagt bei Substanzen, die den Stickstoff an Sauerstoff gebunden enthalten<sup>3</sup>.

Die Erhitzung der mit Natronkalk vermischten Substanz wird in einem einseitig geschlossenen Rohr aus schwer schmelzbarem Glase, mit gekörntem Kalk beschickt, im Verbrennungsofen vorgenommen. Man fängt das Ammoniakgas<sup>4</sup> in einem Absorptionsgefäß mit vorgelegter überschüssiger Säure auf (PELIGOT-Rohr, Birne nach WILL-VARRENTRAPP, Absorptionsgefäß nach FRESSENIUS).

### d) Verfahren nach H. TER MEULEN und J. HESLINGA<sup>5</sup>.

Dieses neuerdings entwickelte Verfahren beruht darauf, daß bei organischen Substanzen, die in Gegenwart von fein verteiltem Nickel als Katalysator auf ungefähr  $150^{\circ}$  im Wasserstoffstrom erhitzt werden, der Stickstoff vollständig zu Ammoniak hydriert wird.

Abb. 15 veranschaulicht die Versuchsanordnung schematisch.

Im Verbrennungsrohr  $AB$  (40 cm lang, 1,5 cm Durchmesser) wird bei  $B$  Wasserstoff eingeleitet (Reinigung zuerst mit alkalischer, dann mit saurer Kaliumpermanganatlösung). Die beiden Asbestpfropfen  $C$  und  $D$  umschließen die Katalysatormasse aus Nickel und Asbest. Das Rohr liegt in einem mit Thermometer  $J$  versehenen Asbestkasten  $H$  und wird mittels zweier Bunsenbrenner erhitzt<sup>6</sup>. Im Porzellanschiffchen  $E$  befindet sich die abgewogene Substanz;  $F$  und  $G$  sind zwei Reiter aus Asbestpappe.

Der Katalysator wird aus 1 Teil kurzfasrigem Asbest und 2 Teilen Nickeloxyd oder an dessen Stelle mit 4 Teilen Nickelformiat hergestellt. Die Reduktion wird im Rohr im

<sup>1</sup> Ein Umfüllen des Stickstoffes in eine Gasbürette (Absperrung durch Wasser) ist überflüssig.

<sup>2</sup> Entnommen L. GATTERMANN: Die Praxis des organischen Chemikers, 23. Aufl., bearbeitet von H. WIELAND. Berlin u. Leipzig: W. de Gruyter & Co. 1933.

<sup>3</sup> Vgl. hierzu A. GOLDBERG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1883, 16, 2547; ferner U. KREUSLER: Landw. Vers.-Stationen 1885, 31, 248.

<sup>4</sup> Man setzt vielfach etwas Zucker zu, bei dessen Verbrennung Kohlendioxyd entsteht, welches das Ammoniak in die Vorlage übertreibt.

<sup>5</sup> H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse, S. 20f. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1927.

<sup>6</sup> Der Asbestkasten hat oben eine Öffnung für den Abzug der Verbrennungsgase der Brenner.

Wasserstoffstrom bei etwa 250° vorgenommen und ist nach 1 Stunde beendet; man läßt im Wasserstoffstrom erkalten.

Die Substanz (etwa 50 mg) wird im Schiffchen mit 1—2 g reduziertem Nickel vermisch und in das Rohr eingebracht. Man läßt langsam Wasserstoff durchströmen (zwei Blasen in der Sekunde) und gießt soviel mit einem Tropfen Methylorange gelb gefärbtes Wasser in das Becherglas bei *K*, daß das Knierohr untertaucht. Man liest in der Feinburette den Stand der 0,05 N-Säure ab und gibt davon einen Tropfen in das Becherglas, wodurch der Indikator nach Rot umschlägt. Die Hydrierung soll langsam und allmählich wie bei der Elementaranalyse (Schiffchen zuletzt mit Schnittbrenner erhitzen) erfolgen und dauert etwa 1 Stunde<sup>1</sup>. Bei *C* abgeschiedenes Wasser muß, da es Ammoniak zurückhalten könnte, durch Erhitzen übergetrieben werden.

Die Ammoniakbildung gibt sich durch Farbumschlag des Indicators zu erkennen. Man sorgt während der Hydrierung durch entsprechenden Zusatz von Säure<sup>2</sup>, daß die Farbe nicht gelb wird. Am Schluß titriert man den Überschuß mit 0,05 N-Natriumcarbonatlösung zurück. Aus der Menge des gefundenen Ammoniaks berechnet man den Stickstoffgehalt (1 cm 0,05 N-Säure entspricht 0,7004 mg Stickstoff).

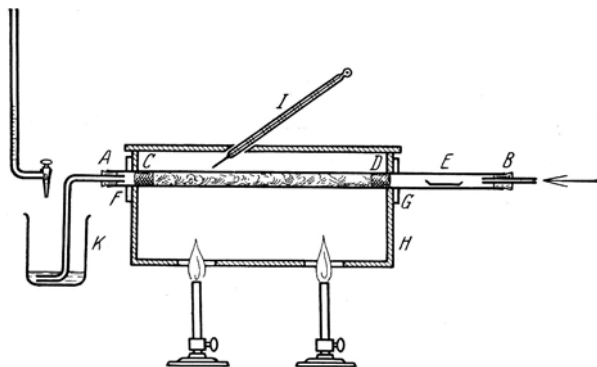


Abb. 15. Apparatur zur Stickstoffermittlung durch Hydrierung.

Sehr explosive Stoffe können nach dieser Methode nicht analysiert werden. Bei Substanzen, die stark verkohlen (Leim, Mehl, Ölkuchen, Eiweiß u. dgl.) ist gegenüber den KJELDAHL-Werten mit einem kleinen Defizit zu rechnen. Bei Eiweiß, Steinkohle und Koks wird, um dies zu vermeiden, die Hydrierung im Quarzrohr ausgeführt, wobei man die Substanz in einem Kupferschiffchen mit wasserfreiem Natriumcarbonat vermisch. Man erhitzt bis auf 300°; Einzelheiten siehe an der Originalstelle.

### 3. Bestimmung der Halogene.

Der für den Nachweis von Halogen in organischen Substanzen notwendige Aufschluß wird im wesentlichen nach den Verfahren von CARIUS, von LIEBIG, von VOLHARD oder von H. PRINGSHEIM ausgeführt<sup>3</sup>. H. TER MEULEN und J. HESLINGA<sup>4</sup> empfehlen die Halogenbestimmung auf dem Wege der Hydrierung.

#### a) Verfahren nach CARIUS.

Die Substanz wird im Einschmelzrohr mit rauchender Salpetersäure im Schieföfen vollständig oxydiert und das freigewordene Halogen durch zugesetztes Silbernitrat in Halogensilber verwandelt; letzteres wird gravimetrisch ermittelt.

<sup>1</sup> Bei explosiblen Stoffen muß die Erhitzung langsamer geleitet werden; Versuchsdauer bis zu 2 Stunden.

<sup>2</sup> Größerer Säureüberschuß ist zu vermeiden, da man im Ausbleiben des Farbumschlages ein wertvolles Anzeichen für das Ende der Analyse hat.

<sup>3</sup> Erwähnt sei hier ferner die auf das Verfahren von BAUBIGNY und CHAVANNE (Chem.-Ztg. 1903, 27, 555) zurückgehende Arbeitsweise von F. VIEBÖCK: Bestimmung von Chlor und Brom in organischen Substanzen auf acidimetrischem Wege. Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1932, 65, 493, 586.

<sup>4</sup> H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organischen Analyse, S. 39. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1927.

Man wägt die Substanz (0,2 g) in einem Röhrchen<sup>1</sup> aus schwer schmelzbarem Glas ab. In das trockne Bombenrohr bringt man 0,5 g festes Silbernitrat (nötigenfalls bis zu 1 g) und mittels eines bis auf den Boden des Rohres reichenden Trichters 2 ccm rote rauchende (halogenfreie) Salpetersäure (beim Herausnehmen des Trichters darf die Rohrwandung nicht naß werden). Dann läßt man unter Schräghalten das Röhrchen mit Substanz hineingleiten, ohne daß letztere mit der Salpetersäure in Berührung kommt. Man schmilzt das Einschlußrohr in der Gebläseflamme zu, läßt erkalten und bringt es, mit dem Boden voraus, in den eisernen Schutzmantel, mit dem es in den Bombenofen eingeschoben wird. Unter langsamem vorsichtigem Anheizen steigert man die Temperatur allmählich und hält etwa 3 Stunden bei 250° (300°), bei schwer oxydierbaren Substanzen entsprechend länger. Nach dem vollständigen Erkalten nimmt man das Rohr mit dem Schutzmantel aus dem Ofen (Vorsicht!). Die aus dem Schutzmantel herausragende Capillare, die man 2—3mal durch die leuchtende Flamme zieht, um die darin enthaltene Flüssigkeit zu vertreiben, hält man dann so lange in eine spitze Flamme, bis das Glas weich geworden ist und der Überdruck gefahrlos entlassen wird. Dann erst entnimmt man das Bombenrohr dem Schutzmantel<sup>2</sup>.

Nach dem Anfeilen wird der obere Teil des Bombenrohres abgesprengt. Man spült den Inhalt (das abgesprengte Stück auch nachspülen) mit Wasser in ein Becherglas (Vorsicht beim Herausgleiten des Substanzröhrchens!), zerdrückt den Niederschlag mit einem Glasstab, erhitzt 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad und filtriert dann das Halogensilber durch einen gewogenen Gooch- oder Filtertiegel ab. Nach dem Auswaschen wird bei 130° bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

$$\begin{aligned} \text{Berechnung: Prozent Chlor} &= \frac{\text{Gewogenes Silberchlorid}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 24,74, \\ \text{Prozent Brom} &= \frac{\text{Gewogenes Silberbromid}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 42,56, \\ \text{Prozent Jod} &= \frac{\text{Gewogenes Silberjodid}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 54,05. \end{aligned}$$

#### b) Verfahren nach LIEBIG.

Das Prinzip dieses allgemein anwendbaren, gegenüber der CARIUS-Methode rascher zum Ziele führenden Verfahrens besteht darin, das Halogen der Analysesubstanz durch Glühen mit Kalk<sup>3</sup> in Calciumhalogenid umzusetzen und aus der Lösung desselben als Silberhalogenid zu fällen.

Ein 50 cm langes, einseitig geschlossenes Verbrennungsrohr wird 5 cm hoch mit Calciumoxyd beschickt (Das Rohr oben reinigen!). Auf diese Schicht gibt man aus einem gewogenen Gläschen die Substanz und wägt zurück. Darüber kommt wieder eine 5 cm hohe Kalkschicht<sup>4</sup>. Durch Rütteln sorgt man für Vermischung. Als Abschluß folgt eine 10 cm lange Kalkschicht mit Asbestbausch. Nachdem man durch Klopfen des Rohres in waagerechter Lage einen Luftkanal hergestellt hat, wird es im Verbrennungsofen zunächst in der der Öffnung zugekehrten Hälfte auf Rotglut erhitzt; erst dann geht man allmählich mit der erhöhten Temperatur an die Substanz heran. Es entweichen brenzlich riechende Dämpfe. Das Erhitzen dauert insgesamt etwa 1 Stunde.

<sup>1</sup> Es muß sich ins Bombenrohr einführen lassen.

<sup>2</sup> Feststellen, ob der Aufschluß vollständig ist; sonst nach Öffnung der Capillare (nötigenfalls neuerlicher Zusatz von 1 ccm roter rauchender Salpetersäure) wieder zuschmelzen und weiter erhitzen.

<sup>3</sup> A. v. BÄBYER zieht Natriumcarbonat vor; Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 1163 (Anmerkung).

<sup>4</sup> Hängengebliebene Substanzteilchen spült man damit ins Rohr.



Das erkaltete Reaktionsgemisch wird vorsichtig in ein geräumiges Becherglas (1 Liter Inhalt) mit etwas Wasser entleert<sup>1</sup>. Man spült das Rohr erst mit Wasser und dann mit verdünnter Salpetersäure (1 : 3) aus. Nun wird das Reaktionsgemisch in verdünnter Salpetersäure gelöst. Von Kohleteilchen, Asbest, Glasplittern wird unter Nachwaschen des Filtrerrückstandes abgetrennt und dann mit Silbernitratlösung in bekannter Weise gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag<sup>2</sup> wird bei 130° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Fehlergrenze ist etwa  $\pm 0,3\%$ .

Bemerkt sei noch, daß bei Anwesenheit von Jod sich bisweilen etwas Jodat bildet. Beim Ansäuern kommt es dann zu einer leichten Abscheidung von Jod, das man durch etwas Natriumsulfit zu Jodion reduziert.

### c) Verfahren nach H. PRINGSHEIM<sup>3</sup>.

In einem Stahltiegel mischt man die Untersuchungssubstanz (0,2 g) mit einem berechneten Überschuß von halogenfreiem Natriumperoxyd<sup>4</sup>. Man stellt in eine hohe Porzellanschale, die mit Wasser bis zur Marke des Tiegels gefüllt ist. Dann wird das Gemenge mit einem glühenden Eisendraht durch das Loch (mit Uhrglas bedecken!) im Deckel hindurch entzündet. Nach dem Erkalten wirft man den Tiegel um, erwärmt bei bedeckter Porzellanschale auf dem Wasserbad, bis der Inhalt gelöst ist, entfernt den abgespülten Tiegel und filtriert von Kohle, Ferrihydroxyd usw. ab. Die gebildeten Halogen- und Persäuren reduziert man nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure durch Zusatz von 1—2 g Natriumsulfit. Man vertreibt die überschüssige Schweflige Säure durch Erwärmen, gibt 3—5 ccm konzentrierte Salpetersäure zu und behandelt das schließlich ausgefällte Halogensilber in der üblichen Art.

Diese Arbeitsweise hat das von VOLHARD angegebene Aufschlußverfahren mit einem Gemisch aus 1 Teil wasserfreiem Natriumcarbonat und 2 Teilen Salpeter im wesentlichen ersetzt.

### d) Verfahren nach H. TER MEULEN und J. HESLINGA<sup>5</sup>.

Erhitzt man organische Substanzen in einer Wasserstoffatmosphäre bei gleichzeitiger Gegenwart von Ammoniak, dann wird das Halogen vollständig in Ammoniumhalogenid übergeführt, das in einfacher Weise quantitativ bestimmt werden kann.

Ein etwa 80 cm langes Quarzrohr wird im FLETCHER-Ofen auf Rotglut gebracht und über die in einem Porzellanschiffchen (außerhalb des Ofens stehend) abgewogene Analysesubstanz ein in bekannter Weise gereinigter und mit Ammoniak beladener Wasserstoff geleitet (3 Blasen in der Sekunde). Man erhitzt die Substanz unter langsamer Steigerung der Temperatur mit einem

<sup>1</sup> Sollte der Inhalt auch beim Klopfen großenteils hängenbleiben, so erhitzt man das trockene Rohr in der Flamme und taucht es dann, um es zu zertrümmern, in Wasser.

<sup>2</sup> Auswaschen des Niederschlages im Tiegel vermeiden; daher unter wiederholter Zugabe von schwach salpetersäurehaltigem Wasser dekantierend filtrieren. Man schütze während aller Operationen das Halogensilber tunlichst vor Licht.

<sup>3</sup> H. PRINGSHEIM: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1903, **36**, 4244; 1905, **38**, 2459; 1908, **41**, 4270.

<sup>4</sup> Auf Substanzen mit 75% und mehr Kohlenstoff, Wasserstoff und Halogen nimmt man den 18fachen, auf solche mit 50—75% den 16fachen Überschuß. Bei Verbindungen mit 25—50% Kohlenstoff, Wasserstoff und Halogen gibt man die halbe, bei solchen mit noch weniger dieser 3 Elemente die gleiche Menge einer kohlenstoffreichen Substanz zu (Zucker, Naphthalin usw.); der Natriumperoxydüberschuß wird dann auf das 18fache bemessen.

<sup>5</sup> H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse, S. 39. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1927.

Bunsenbrenner; die Vergasung für 20—50 mg soll wenigstens 30 Minuten in Anspruch nehmen.

Das gebildete Ammoniumhalogenid, das sich hinter dem FLETCHER-Ofen als Sublimat abgesetzt hat, wird nach dem Erkalten mit Wasser herausgelöst. Man erhitzt die etwas mit Essigsäure angesäuerte Lösung (Vertreiben von Blausäure!) und titriert dann das Halogen mit 0,05 N-Silbernitratlösung nach VOLHARD.

#### 4. Bestimmung des Schwefels.

Die Methoden zur Ermittlung des Schwefels laufen im wesentlichen auf seine Oxydation zu Schwefelsäure und deren Bestimmung als Bariumsulfat hinaus. Neuerdings werden aber auch Reduktionsverfahren (Bildung von Schwefelwasserstoff) beschrieben.

##### a) Verfahren nach CARIUS; Aufschluß auf nassem Wege.

Die Schwefelbestimmung erfolgt im Bombenrohr wie bei der schon beschriebenen Halogenbestimmung, natürlich ohne Silbernitrat. Der vollendete Aufschluß gibt sich an der klaren Lösung des Reaktionsgemisches zu erkennen. Man spült es aus dem geöffneten Rohr mit Wasser in eine Porzellanschale über, dampft zur Vertreibung der Salpetersäure auf dem Wasserbad bis zur Trockne<sup>1</sup> ein, nimmt wieder mit Wasser und etwas Salzsäure auf, filtriert gegebenenfalls (Glassplitter) und fällt in der Siedehitze mit einer heißen Lösung von Bariumchlorid. Nach dem Absitzen wird durch ein Papierfilter oder einen Filtertiegel abfiltriert und der Niederschlag nach den Regeln der Analytik zur Wägung gebracht.

$$\text{Berechnung: Prozent Schwefel} = \frac{\text{Gewogenes Bariumsulfat}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 13,73.$$

Bei sehr schwefelarmen Verbindungen müßte die Einwaage so vergrößert werden, daß der Aufschluß im Bombenrohr auf Schwierigkeiten stößt.

##### b) Aufschluß auf trockenem Wege.

Eine ganze Reihe von Verfahren<sup>2</sup> ist ausgearbeitet worden, die unter Anwendung verschiedener Oxydationsmittel die Überführung des Schwefels in Schwefelsäure erstreben. Eingebürgert hat sich vor allem das Verbrennen der Substanz im Stahltiegel mit Natriumperoxyd nach H. PRINGSHEIM<sup>3</sup>. Das Arbeitsverfahren ist analog demjenigen der entsprechenden Halogenbestimmung. Auch die Methode der Oxydation der Substanz in der calorimetrischen Bombe ist für diese Zwecke herangezogen worden.

##### c) Aufschluß im Sauerstoffstrom.

Ist ein sonstiger, verlustloser Aufschluß nicht möglich, dann verbrennt man im geschlossenen Rohr in einer Sauerstoffatmosphäre. Hierfür ist eine ganze Anzahl von Arbeitsmethoden angegeben worden<sup>4</sup>; über das Verfahren nach M. DENNSTEDT s. S. 591. Hier seien noch die bekannten Verfahren von TOLLENS und BARLOW<sup>5</sup>,

<sup>1</sup> Bei Anwesenheit von Salpetersäure könnte Bariumnitrat mit in den Niederschlag gelangen.

<sup>2</sup> Dabei ist vielfach mit Verlusten an leicht flüchtig gehendem Schwefel zu rechnen, wie eigene Versucheargetan haben.

<sup>3</sup> H. PRINGSHEIM: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, 41, 4270.

<sup>4</sup> Vgl. Literaturübersicht bei H. SIMONIS: Organische Elementaranalyse. In J. HOUBEN: Die Methoden der organischen Chemie, Bd. 1, Allgemeiner Teil, S. 76, 77. Leipzig: Georg Thieme 1925.

<sup>5</sup> J. KÖNIG: Untersuchung landwirtschaftlicher und landwirtschaftlich-gewerblich wichtiger Stoffe, 5. Aufl., Bd. 1, S. 318. Berlin: Paul Parey 1923.

von A. SAUER<sup>1</sup> und von O. BRUNCK<sup>2</sup> erwähnt. M. HOLLIGER<sup>3</sup> hat die Verfahren von SAUER und BRUNCK vereinigt. Er geht folgendermaßen vor:

Etwa 1 g fein gepulverte Kohle bzw. sonstige Substanz<sup>4</sup> wird mit 2 g eines Gemenges aus 2 Teilen schwefelsäurefreiem Kobaltoxyd und 1 Teil entwässertem Natriumcarbonat in einer Reibschale gemischt. Die Verreibung überführt man verlustlos in ein Porzellan- oder Platinschiffchen. Letzteres wird in eine etwa 85 cm lange Verbrennungsröhre eingeschoben, die auf eine Strecke von 3—5 cm so stark eingengt ist, daß das Lumen nur noch 5—7 mm beträgt (Abb. 16). Diese Stelle wird vollständig mit dünnem Platindraht als Kontaksubstanz gefüllt.

Das Rohr wird in ein Eisengestell wie bei der DENNSTEDT'schen Verbrennung gelegt und die Kontaksubstanz unter Bedecken mit einem Blechdach vor dem Einführen des Schiffchens mit Substanz durch einen Teklubrenner zum Glühen

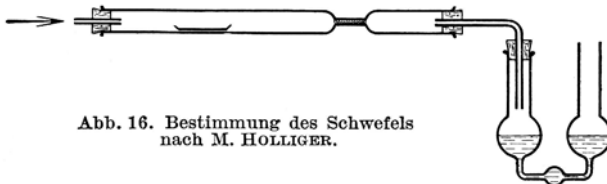


Abb. 16. Bestimmung des Schwefels nach M. HOLLIGER.

erhitzt. Gleichzeitig werden zwei PELIGOT'sche Absorptionsröhre mit 1%iger Hydroperoxydlösung oder mit Bromlösung vorgelegt. Das bis auf einige Zentimeter an die Kontaksubstanz herange-

schobene Substanzschiffchen wird, nachdem die Apparatur mit Sauerstoff durchströmt (2 Blasen in der Sekunde) und damit gefüllt ist, zunächst in seinem linken Teile vorsichtig erwärmt, indem man hier ein Blechdach überstülpt. Die Substanz fängt meist bald an zu glühen und brennt ohne neuerliche Wärmezufuhr weiter; andernfalls erhitzt man stärker. Nach vollendeter Verbrennung wird der Inhalt des Schiffchens verlustlos in eine Porzellanschale gebracht und behufs Abscheidung etwa vorhandener Kieselsäure mit Salzsäure zur Trockne verdampft. Inzwischen wird die Oxydationsflüssigkeit aus der PELIGOT-Röhre in ein Becherglas übergeführt — bei Verwendung von Hydroperoxyd unter Zusatz von Alkali — dann erhitzt und schließlich zum Rückstand in der Schale gegeben. Das Ganze wird angesäuert und filtriert; im Filtrat bestimmt man die Schwefelsäure gravimetrisch als Bariumsulfat (Gesamt-Schwefel). Es werden auch die titrimetrische Bestimmung mit Bariumchromat sowie diejenige mit Benzidin empfohlen.

Verbrennt man nach dem vorstehenden Verfahren die Substanz für sich allein, d. h. ohne Zumischung von Kobaltoxyd und Natriumcarbonat, so erhält man in der PELIGOT-Vorlage den flüchtigen Schwefel. Aus der Differenz beider Bestimmungen ergibt sich dann die Menge des in der Asche verbleibenden gebundenen Schwefels.

#### d) Hydrierung des Schwefels zu Schwefelwasserstoff<sup>5</sup>.

Man benutzt hierzu (Abb. 17) ein 40 cm langes Quarzrohr *AB*, das zwischen den Asbestpfropfen *C* und *D* mit platinierterm Asbest<sup>6</sup> als Katalysator beschickt ist. Dieser Teil des Rohres wird im FLETCHER-Ofen erhitzt. Der Absorptionsapparat *E* enthält Glasperlen und verdünnte Natronlauge zum Auffangen des

<sup>1</sup> A. SAUER: Zeitschr. analyt. Chem. 1873, 12, 178.

<sup>2</sup> O. BRUNCK: Zeitschr. angew. Chem. 1905, 18, 1560.

<sup>3</sup> M. HOLLIGER: Zeitschr. angew. Chem. 1909, 22, 436.

<sup>4</sup> Das Verfahren ist zwar nur für Kohle und Koks ausgearbeitet, dürfte sich aber auch für andere Stoffe eignen.

<sup>5</sup> H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse, S. 29. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1927.

<sup>6</sup> Hergestellt, indem man kurzfasrigen Asbest mit einer 5%igen Lösung von Platinchlorwasserstoffsäure tränkt und nach dem Trocknen ausglüht.

Schwefelwasserstoffs. Die Substanz befindet sich im Schiffchen *F*; bei Flüssigkeiten benutzt man ein Glaskügelchen. Man verdrängt zunächst die Luft aus dem Apparat durch Kohlendioxyd und dann dieses Gas durch Wasserstoff. Dann füllt man in das Absorptionsgefäß soviel Natronlauge, daß die Perlen bedeckt sind. Hernach schiebt man das Schiffchen ein, leitet Wasserstoff (zwei Blasen in der Sekunde) durch, erhitzt die Kontaktsubstanz auf Rotglut und nimmt langsam die Verdampfung der Substanz und damit die Hydrierung des Schwefels vor. 20—30 mg Substanz brauchen hierzu 20—30 Minuten.

Nach Beendigung der Hydrierung läßt man den Inhalt des Absorptionsgefäßes in einen Überschuß von angesäuerter 0,05 N-Jodlösung fließen, spült mit

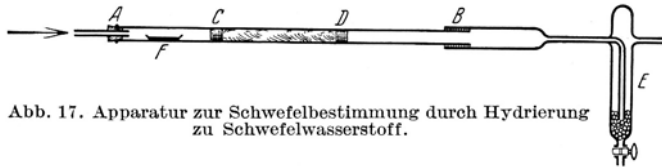


Abb. 17. Apparatur zur Schwefelbestimmung durch Hydrierung zu Schwefelwasserstoff.

luftfreiem Wasser nach und titriert den Jodüberschuß mit 0,05 N-Natriumthiosulfatlösung. Aus dem Jodverbrauch berechnet man den gebildeten Schwefelwasserstoff und daraus in bekannter Weise den Schwefelgehalt der Substanz (1 ccm 0,05 N-Jodlösung = 0,8015 mg Schwefel).

Bei besonderen Fällen können sich Abänderungen dieser Arbeitsvorschrift notwendig machen; s. hierüber die Originalstelle.

## 5. Bestimmung des Phosphors.

Die meist angewandte Methode besteht darin, die Substanz im Bombenrohr nach *CARIUS* mit roter rauchender Salpetersäure zu zersetzen und den Phosphor zu Phosphorsäure zu oxydieren. Sind Schwermetalle und Erdalkalien abwesend, insbesondere auch Arsen, so kann man aus dem Aufschluß nach entsprechender Vorbereitung unmittelbar Ammoniummagnesiumphosphat ausfällen und als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung bringen.

$$\text{Berechnung: Prozent Phosphor} = \frac{\text{Gewogenes Magnesiumpyrophosphat}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 27,87.$$

Bei sehr resistenten Substanzen schließt man erst nach *CARIUS* auf, neutralisiert dann die salpetersaure Flüssigkeit mit Natriumcarbonat, dampft ein und verascht nach *LIEBIG* mit Kaliumhydroxyd und Salpeter. Man kann die Substanz auch nach *H. PRINGSHEIM* am besten im Silbertiegel mit Natriumperoxyd oxydieren.

Als sehr widerstandsfähig erweisen sich fettreiche Stoffe (z. B. Phosphatide). Hierbei bedient man sich zweckmäßigerweise des Aufschlusses nach *A. NEUMANN*<sup>1</sup> mit einem Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und konzentrierter Salpetersäure; durch schließliche Zugabe von Perhydrol (30% ig) vollendet man die Oxydation (s. auch S. 600). Die Phosphorsäure wird dann am besten nach dem Molybdänverfahren entweder gravimetrisch nach der Methode von *LORENZ*<sup>2</sup>:

$$\text{Prozent Phosphor} = \frac{\text{Gewogenes Ammoniumphosphormolybdat}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 1,435$$

oder acidimetrisch (1 ccm 0,1 N-Natronlauge = 0,1108 mg Phosphor) bestimmt<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> *A. NEUMANN*: Zeitschr. physiol. Chem. 1902, 37, 115; 1904, 43, 32.

<sup>2</sup> Faktor empirisch ermittelt.

<sup>3</sup> Auf Grund eigener Untersuchungen gibt *TH. VON FELLEBERG* (Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 205) an, daß bei dem nach *VON LORENZ* gefällten Phosphormolybdat-Niederschlag bei der acidimetrischen Titration 1 ccm 0,1 N-Natronlauge = 0,1080 mg Phosphor entspricht.

## 6. Elementaranalyse nach M. DENNSTEDT<sup>1</sup>.

Die gegenüber der Verbrennung nach LIEBIG vereinfachte Methode beruht darauf, daß die Dämpfe einer im Sauerstoffstrom allmählich verbrennenden Substanz beim Heranführen an einen glühenden Platinkontakt und nochmaliger Zuleitung von überschüssigem Sauerstoff vollständig oxydiert werden. Durch geeignete Anordnung ist es M. DENNSTEDT gelungen, ein Verfahren zu entwickeln, das bei Gas- und Raumsparnis in experimentell vereinfachter Form bei geringem Substanzverbrauch relativ schnell zum Ziele führt. Als weiterer Vorteil kommt hinzu, daß die Analyse die gleichzeitige Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff neben Schwefel und Halogen ermöglicht. Der Rückstand der Analysesubstanz kann als „Asche“ gewogen werden. Das Verfahren nach M. DENNSTEDT liefert insbesondere auch bei solchen Stoffen, die anorganische Bestandteile enthalten und die z. B. bei der gewöhnlichen Verbrennung zusammenschmelzen und Kohlenstoff hartnäckig festhalten, sehr zuverlässige Resultate.

Es verbietet der Raum, auf die Einzelheiten einzugehen. Deshalb soll das Verfahren nur in seinen wichtigsten experimentellen Tatsachen kurz dargestellt werden; im übrigen sei auf die Originalliteratur verwiesen.

Die Verbrennungsapparatur nach M. DENNSTEDT ist in Abb. 18 schematisch dargestellt.

Der zu benutzende Sauerstoff — er muß von Wasserstoff frei sein — befindet sich im Gasometer<sup>2</sup> *A* und wird von da mittels eines mit Schraubenquetschhahn versehenen nahtlosen Gummischlauches in den Trockenturm *B* geleitet, der mit konzentrierter Schwefelsäure und Chlorcalcium (Natronkalk) beschickt ist. Beim Austritt daraus verzweigt sich der Gasstrom in zwei Leitungen, die mit Gummischlauch, jeweils mit Quetschhahn versehen, zur Vorrichtung für die sog. doppelte Sauerstoffzuleitung *C* (Einzelheiten Abb. 19) führen. Letzere sorgt dafür, daß der Sauerstoff einmal unmittelbar über die zu verbrennende Substanz streicht (Vergasungsstrom), zum andern kurz vor dem Ort der vollständigen Verbrennung durch den Platinkontakt nochmals zugemischt wird (Verbrennungsstrom).

Die doppelte Sauerstoffzuführung (Abb. 19) besteht aus einem Capillarrohr (etwa 22 cm lang), das sich an der einen Seite zu einem das Verbrennungsrohr bis auf einen kleinen Zwischenraum ausfüllenden Einsatzrohr (etwa 18 cm lang und 1,4 cm im Querschnitt) erweitert; das Rohr ist aus schwer schmelzbarem

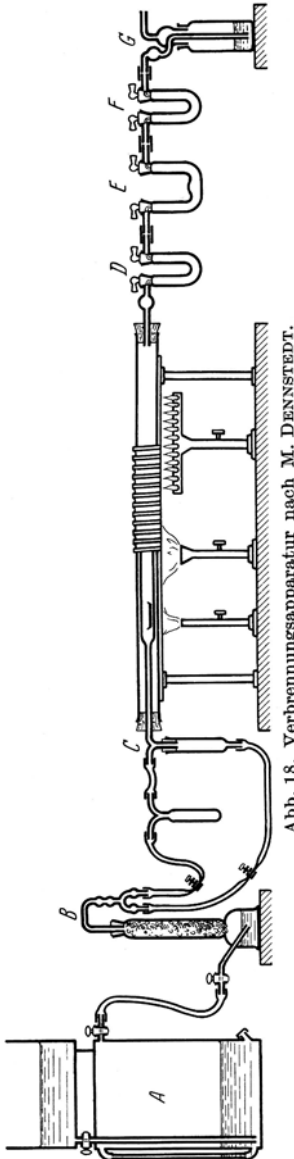


Abb. 18. Verbrennungsapparatur nach M. DENNSTEDT.

<sup>1</sup> M. DENNSTEDT: Anleitung zur vereinfachten Elementaranalyse, 4. Aufl. Hamburg: O. Meißners Verlag 1919.

<sup>2</sup> M. DENNSTEDT wendet dafür zwei Glasflaschen an, deren eine als Vorratsgefäß, deren andere als Druckgefäß dient.

Glase hergestellt. Der weite Teil nimmt das Schiffchen mit Substanz auf. Über das Capillarrohr wird auf der andern Seite ein etwas weiteres T-Rohr geschoben. Letzteres trägt einmal einen Gummistopfen, mit dem die ganze Anordnung in das Verbrennungsrohr eingesetzt wird, während auf der Außenseite das T-Rohr mit dem Ende des Capillarrohres durch einen Gummischlauch zusammengehalten und weiterhin mit dem Blasenähler<sup>1</sup> verbunden ist. Das abwärts gerichtete Ansatzstück des T-Rohres trägt ein mit Gummistopfen verschlossenes Chlorcalciumrohr mit Röhrenansatz. Wenn die Apparatur in das

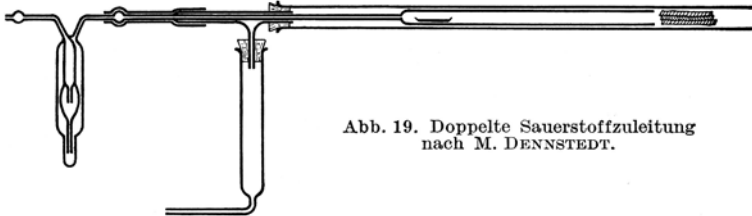


Abb. 19. Doppelte Sauerstoffzuleitung  
nach M. DENNSTEDT.

Verbrennungsrohr eingepaßt ist, soll das weite Einsatzrohr den Platinkontakt eben berühren.

Der durch den Blasenähler strömende Sauerstoff überstreicht, wie dies Abb. 19 zeigt, das im Einsatzrohr befindliche Schiffchen mit Substanz (Vergasungsstrom), während der durch das Chlorcalciumrohr zugeführte Sauerstoff erst unmittelbar vor dem Platinkontakt hinzutritt (Verbrennungsstrom). Durch zwei Schraubenhähne läßt sich die Gaszufuhr fein regeln.

Das Verbrennungsrohr (etwa 85 cm lang, 1,7 cm Durchmesser) liegt auf einem etwa 80 cm langen, mit Asbestpapier ausgekleideten Winkeleisen mit etwa 20 cm hohen, eisernen Füßen<sup>2</sup>. Man braucht ferner ein etwa 25 cm und vier etwa 12 cm lange, mit Asbest ausgelegte eiserne Winkelbleche, die als Dach für das Verbrennungsrohr dienen.

Etwa 35 cm von der Seite der Sauerstoffzufuhr entfernt liegt der Platinkontakt<sup>3</sup>, meist ein etwa 6 cm langer, aus 6 dünnen Blechen sternartig verschweißter Platinkörper („Platinstern“, vgl. Abb. 19). Der den Absorptionsgefäßen zugewandte Teil des Verbrennungsrohres wird durch ein verstellbares Flammenrohr mit etwa 20 Bohrungen (Abb. 18) auf 300–320° und der Platinstern mittels eines kräftigen Bunsen- oder Teklubrenners mit Breitspalt (Verbrennungsflamme) auf helle Rotglut erhitzt. Ein zweiter beweglicher Bunsenbrenner, dem man später ebenfalls einen Spaltaufsatz gibt, dient zum Erhitzen des Schiffchens mit Substanz.

Zur Absorption des Wassers wird mittels eines durchbohrten Gummistopfens, der vor dem Gebrauche bei 100° getrocknet und dann immer im Exsiccator aufbewahrt wird, das Chlorcalciumrohr *D* eingesetzt, die Seite mit dem kugeligen Wassersack dem Verbrennungsrohr zugekehrt. Man verwendet hierzu eine Ausführung, bei der die beiden Seitenstücke mit aufgeschliffenen Glaskappen

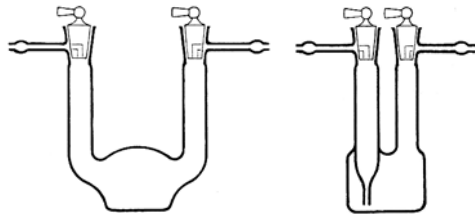


Abb. 20. Natronkalkapparate.

<sup>1</sup> Der mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure beschickte Blasenähler besitzt ein fein ausgezogenes Gaseinleitungsrohr, wodurch der Sauerstoff nur in sehr kleinen Blasen austreten kann.

<sup>2</sup> Man hat auch elektrisch heizbare Anordnungen entwickelt.

<sup>3</sup> Auch zusammengerolltes Platinblech oder ein Knäuel aus Platindraht sind anwendbar.

dicht abgeschlossen werden können<sup>1</sup>. An dieses Rohr schließt sich, Glas an Glas stoßend, der mit Glashähnen verschließbare Natronkalkapparat<sup>2</sup> *E* in Enten- oder Stempelform an (Abb. 20).

Da das bei der Bindung des Kohlendioxyds aus dem Natronkalk entstehende Wasser vom trocknen Gasstrom entführt werden könnte, wird dahinter noch ein U-Rohr *F* angeschlossen, das zu  $\frac{2}{3}$  mit Natronkalk und zu  $\frac{1}{3}$  mit Chlorcalcium beschickt ist. Beträgt bei einem Versuch die Gewichtszunahme dieses Gefäßes mehr als 1 Zentigramm, dann muß der Natronkalkapparat neu beschickt werden. Den Abschluß der Absorptionsgefäße bildet die Waschflasche *G* mit verdünnter Palladiumchlorürlösung (1%ig). Sie dient als Blasenähler zur Kontrolle des Gasstromes; anderseits würde sie die unvollständige Verbrennung (Bildung von Kohlenmonoxyd) durch Auftreten einer Trübung anzeigen.

#### a) Verbrennung bei ausschließlicher Anwesenheit von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff.

Um das Verbrennungsrohr zu trocknen, erhitzt man es zunächst ohne Absorptionsgefäße auf etwa 300° und leitet dann einen lebhaften Strom von Sauerstoff hindurch. Nach dem Ansetzen eines geraden Chlorcalciumrohres läßt man bei langsamer Sauerstoffzufuhr erkalten. Währenddessen wird die Substanz am besten in einem dreiteiligen Porzellanschiffchen<sup>3</sup> abgewogen.

Nun schließt man die gewogenen Absorptionsgefäße<sup>4</sup> an, zieht den Apparat für die doppelte Sauerstoffzuleitung heraus, schiebt das Schiffchen in das Einsatzrohr bis an die capillare Verengung und paßt die Vorrichtung wieder gasdicht in das Verbrennungsrohr in der Weise ein, daß der Platinstern gerade berührt wird. Um das Ansammeln explosibler Gase im leeren Teil des Einsatzrohres hintanzuhalten, schiebt man außer dem Schiffchen noch einen das Einsatzrohr fast ausfüllenden Glasstab aus schwer schmelzbarem Glas ein, der eine Öse zum Anfassen hat und darin ein Bündel Platindraht als Kontaksubstanz. Das Ende des Einsatzrohres wird mit einem mittelstarken Platindraht umschlungen, damit sich an dieser Stelle der starken Erhitzung Einsatz- und Verbrennungsrohr nicht direkt berühren (Ankleben!).

Nun beginnt man mit der Sauerstoffzufuhr; bei leicht flüchtigen Substanzen sollen etwa 5—10 Bläschen, bei schwerer flüchtigen etwa 10—30 innerhalb 10 Sekunden durch den Blasenähler gehen (Vergasungsstrom). Der Verbrennungsstrom wird nach den Blasen (10—15 in 10 Sekunden, vorübergehend bei rascher Vergasung der Substanz auch bis zu 30) im Palladiumchlorürläschen eingestellt.

Zuerst wird die Flamme unter dem Platinstern entzündet; die Temperatur wird soweit gesteigert, daß dieser bei aufgelegtem kleinem Dach zum Glühen kommt. Hernach heizt man unter Überstülpen des großen Daches mit dem Flammenrohr (Abb. 18) auf 300—320° an. Der den Absorptionsgefäßen zugewandte Teil des Rohres soll zunächst noch kalt bleiben, um die Kondensation von Wasser und damit den Beginn der Verbrennung feststellen zu können. Wenn der Kontaktstern glüht, wird die Vergasungsflamme unter der Substanz klein

<sup>1</sup> Diese Konstruktion ermöglicht den Abschluß des Chlorcalciumrohres nach außen; es behält dauernd seine Sauerstoffatmosphäre und wird in diesem Zustand gewogen. Auf diese Weise fällt die lästige Verdrängung des Sauerstoffes durch Luft vor der Wägung weg. Analoges gilt für den Natronkalkapparat.

<sup>2</sup> Da Natronkalk im feuchten Zustand das Kohlendioxyd besser absorbiert als im trockenen, wird er vor der Füllung etwas angefeuchtet.

<sup>3</sup> M. DENNSTEDT wägt das Schiffchen in einem Glasschliffgläschen ab, in einem sog. „chemischen Schweinchen“; er trocknet darin auch bis zur Gewichtskonstanz. Flüssigkeiten werden in üblichen Glaskügelchen abgewogen.

<sup>4</sup> Prüfung der gesamten Apparatur auf Dichtigkeit in üblicher Weise.

entzündet, und zwar je nach deren Flüchtigkeit mehr oder minder weit nach dem capillaren Ansatz zu verschoben.

Man rückt mit der Vergasungsflamme nur sehr langsam in Richtung auf die Substanz vor, bis die Oxydation, am Kondenswasser ersichtlich, beginnt. Kommt sie zum Stillstand, so nähert man sich von der andern Seite her mit der Verbrennungsflamme unter Mitnahme des Daches. Wird die Zersetzung zu heftig, so entfernt man zunächst die Verbrennungsflamme etwas, später auch noch die Vergasungsflamme. Am Verhalten des Platinsterns ist die Oxydation kontrollierbar. Er glüht dabei meist hell auf<sup>1</sup>; man sucht diesen Zustand zu erhalten. Endgültig bleibt die Vergasungsflamme dort stehen, wo Capillare und Einsatzrohr zusammenstoßen. Erlahmt die Umsetzung, dann nähert man von der andern Seite her zunächst das Dach über dem Platinstern etwas dem Schiffchen und, wenn das ohne Einfluß bleibt, auch die Verbrennungsflamme<sup>2</sup>; mindestens ein Teil des Platinsterns muß aber immer noch erhitzt werden. Diese Operationen werden bis zur vollständigen Verkohlung oder Verdampfung der Substanz fortgesetzt. Auch über dem Einsatzrohr setzt man zur Erhöhung der Temperatur ein Dach auf.

Nun verbreitert man die Vergasungsflamme durch Aufsetzen eines Spaltes und stülpt außerdem über das Schiffchen ein kurzes Dach; gleichzeitig wird der innere Sauerstoffstrom etwas verstärkt. Die Kohle verbrennt meist rasch. Durch den äußeren Gasstrom ist immer ausreichend Sauerstoff zuzuführen.

Eine Verbrennung dürfte bei einiger Erfahrung in etwa 30 Minuten beendet sein. Man dreht dann die Flamme allmählich niedriger und läßt im Sauerstoffstrom<sup>3</sup> erkalten. Die Absorptionsgefäße werden abgenommen, verschlossen, im Wägezimmer zur Temperierung stehen gelassen, zum Druckausgleich kurz geöffnet und sodann gewogen. Die Berechnung ist, wie früher angegeben.

Durch Zurückwägen des Schiffchens erfährt man die „Asche“ der untersuchten Substanz.

#### b) Verbrennung bei Anwesenheit von Stickstoff, Schwefel oder Halogenen.

Die durch die Anwesenheit dieser Stoffe auftretenden störenden Zersetzungsprodukte (Stickoxyde, Schwefeldi- und -trioxyd, Halogen bzw. Halogenwasserstoff) läßt man durch carbonatfreies Bleidioxyd<sup>4</sup> aufnehmen. Von der Seite der Absorptionsapparate her schiebt man ein etwa 14 cm langes Porzellanschiffchen mit 8—10 g Bleidioxyd bis auf einen Abstand von etwa 8 cm an den Platinstern<sup>5</sup> heran und zur weiteren Sicherheit unter Umständen noch ein zweites kleineres Schiffchen mit 1—2 g Bleidioxyd. Beide Schiffchen werden auf 300 bis 320° erhitzt. Die Verbrennung vollzieht sich im übrigen wie schon beschrieben.

#### e) Bestimmung von Schwefel oder von Halogenen.

Die Ermittlung dieser Stoffe kann grundsätzlich mit derjenigen von Kohlenstoff und Wasserstoff verknüpft werden; Stickstoff stört nicht.

<sup>1</sup> Oft glüht auch das Platinbüschel am Glasstab auf.

<sup>2</sup> Das Erhitzen des Einsatzrohres mit der allmählich zu nähernden Verbrennungsflamme ist erforderlich, damit sich die bei der Vergasung gebildeten Dämpfe nicht wieder verdichten. Es könnte sonst vorkommen, daß Flüssigkeit auf den heißesten Teil des Verbrennungsrohres heraustropft; bei der dann erfolgenden plötzlichen Gasentwicklung bestände die Gefahr, daß die Gase den Platinstern unverbrannt überschreiten.

<sup>3</sup> Das Verbrennungsrohr ist zur neuen Analyse bereit.

<sup>4</sup> Es wird im Verbrennungsrohr selbst getrocknet.

<sup>5</sup> Bleidioxyd darf nie auf den Platinstern kommen, weil dadurch die Kontaktwirkung aufgehoben wird. Derart „vergiftete“ Platinsterne werden durch Auskochen mit mäßig verdünnter Salpetersäure regeneriert.



Schwefel. Bei Anwesenheit von Schwefel schiebt man das erste lange Bleidioxyd-Schiffchen (6 g Bleidioxyd) bis auf 6—7 cm an den Platinstern heran, das zweite kürzere (2 g Bleidioxyd) hinterher. Dies ist erforderlich, damit das gebildete Trioxyd von der Bleiverbindung als Sulfat gebunden wird, ehe es sich mit Wasser zu Schwefelsäure umsetzt; letztere würde unter Umständen an der Wandung des Verbrennungsrohres entlang kriechen, ohne mit dem Bleidioxyd zur Reaktion zu kommen.

Man verwendet sulfatfreies Bleidioxyd (Prüfen!) und verbrennt wie sonst. Nach beendigtem Versuch werden die Schiffchen<sup>1</sup> in ein Becherglas entleert und unter Erwärmen mit einer 5%igen Lösung von Natriumcarbonat nachgespült. Das Bleidioxyd wird nun auf dem siedenden Wasserbad 1 Stunde lang mit der Natriumcarbonatlösung digeriert. Nach dem Abkühlen füllt man im Meßkolben auf 100 ccm auf. Da 7—8 g Bleidioxyd einen Raum von etwa 1 ccm einnehmen, setzt man noch 1 ccm Wasser hinzu. Man filtriert ab und bestimmt in einem aliquoten Teil in bekannter Weise die Schwefelsäure als Bariumsulfat.

Halogene. Bei stickstofffreien halogenhaltigen Substanzen schiebt man hinter dem Platinstern zwei gewogene Schiffchen mit konstant getrocknetem molekularem Silber ein. Ihre Gewichtszunahme bei der Verbrennung gibt unmittelbar die Menge an Halogen an.

Bei stickstoffhaltigen Substanzen, vor allem wenn auch noch Schwefel anwesend ist, nimmt man die Absorption am besten mit Bleidioxyd vor<sup>2</sup>; es enthält nach der Analyse Schwefel als Sulfat, Chlor als Chlorid und Oxychlorid, Brom als Oxybromid.

Das Bleidioxyd wird mit 20%iger reiner Natronlauge ausgezogen; man füllt zu einem bestimmten Volumen auf und ermittelt in je aliquoten Anteilen die Halogene mit Silbernitrat, die Schwefelsäure mit Bariumchlorid.

#### d) Bestimmung des Stickstoffs.

An Stelle der vielflammigen Verbrennungsöfen, wie sie J. B. DUMAS für seine Methode vorschreibt, kann man auch unter analoger Beschickung des Verbrennungsrohres die Anordnung nach M. DENNSTEDT benutzen.

Bemerkt sei ferner, daß sich nach M. DENNSTEDT die Ermittlung von Stickstoff mit derjenigen von Kohlenstoff und Wasserstoff bei gleichzeitiger Anwesenheit von Schwefel und Halogenen verknüpfen läßt. Man verbrennt bei üblicher Beschickung des Verbrennungsrohres (einschließlich Bleidioxyd) mit reinem Sauerstoff und schließt hinter dem Palladiumchlorürfläschchen noch einen Erlenmeyerkolben mit Druckbirne an. Der mit dem überschüssigen Sauerstoff entweichende gasförmige Stickstoff wird hier aufgefangen, mittels einer salzsauren Lösung von Cuprochlorid vom Sauerstoff befreit und volumetrisch gemessen. Der andere vom Bleidioxyd als Bleinitrat zurückgehaltene Stickstoff wird ebenfalls bestimmt<sup>3</sup>. Die Summe ergibt den Gesamtgehalt an Stickstoff.

### 7. Sonstige Verfahren der Elementaranalyse.

Das Streben nach Ausgestaltung der Verfahren der Elementaranalyse, insbesondere bei solchen Substanzen, die bei der gewöhnlichen Arbeitsweise Schwierigkeiten in den Weg legen, hat zu mannigfachen neuen Vorschlägen geführt. Für explosible Stoffe z. B. kann man unter Umständen mit gutem

<sup>1</sup> Kontaktstern und Verbrennungsrohr können etwas Schwefelsäure enthalten; man spült sie daher mit Wasser nach, das mit zur Bestimmung benutzt wird.

<sup>2</sup> Andere Verfahren siehe bei M. DENNSTEDT.

<sup>3</sup> Man extrahiert das Bleidioxyd mit 33%igem Alkohol, worin das Bleinitrat löslich ist, dampft das Filtrat ein und wägt den trocknen Rückstand.

Erfolg die von M. BERTHELOT angegebene und von W. HEMPEL<sup>1</sup> ausgearbeitete Methode der Verbrennung in der calorimetrischen Bombe benutzen; bezüglich ihrer Einzelheiten sei auf die Originalliteratur verwiesen<sup>1</sup>. Weitere Verfahren sind die sog. nasse Verbrennung sowie die Analyse auf dem Wege der Hydrierung.

#### a) Bestimmung des Kohlenstoffs auf nassem Wege.

Die Oxydation einer Substanz auf nassem Wege unter Bildung von Kohlendioxyd, das quantitativ abgefaßt wird, ist vor allem bei explosiblen Stoffen, ferner bei stark schwefel-, arsen- oder phosphorhaltigen Substanzen sowie bei biologischem Material von Interesse. Man kennt eine Reihe solcher Arbeitsverfahren; hier sei nur dasjenige von H. SIMONIS und F. H. THIES<sup>2</sup> erwähnt.

Bei der von ihnen entwickelten Methode werden zur Oxydation Kaliumdichromat und Schwefelsäure benutzt. Die gebildeten Zersetzungsprodukte oxydiert man unter Zufuhr von Sauerstoff durch Leitern über glühendes Kupferoxyd in einem Verbrennungsrohr zu Ende. Das entstandene Kohlendioxyd wird in einem entsprechend vorbereiteten Chlorcalciumrohr getrocknet, dann in einem Kaliapparat absorbiert und zur Wägung gebracht. Die Substanz (0,2 g) verbrennt man am besten im Platinschiffchen.

#### b) Bestimmung des Sauerstoffs durch Hydrierung<sup>3</sup>.

Das Verfahren beruht darauf, daß der Sauerstoff einer organischen Verbindung durch energische Hydrierung vollständig in Wasser übergeführt werden kann; letzteres wird im Chlorcalciumrohr aufgefangen und dann zur Wägung gebracht.

Die Analysensubstanz wird in einem Quarzrohr geglüht. Die Produkte der trockenen Destillation leitet man durch glühenden Asbest, wo Zersetzung in

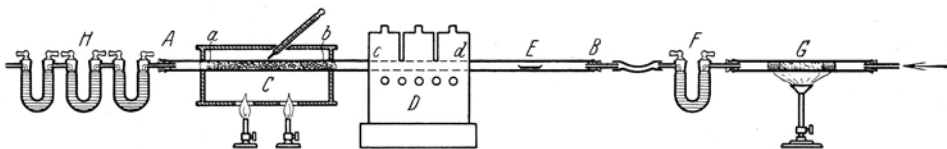
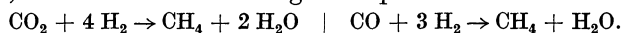


Abb. 21. Apparat zur Bestimmung von Sauerstoff nach H. TER MEULEN und J. HESLINGA.

Wasser, Kohlenmonoxyd, Kohlendioxyd und einfache Kohlenwasserstoffe erfolgt. Dieses Gasgemenge wird dann mit Wasserstoff vermischt und über fein verteiltes, auf 350<sup>0</sup> (unter Umständen noch höher) erhitztes Nickel als Katalysator geleitet, wo sich die Umsetzungen abspielen:



Die erforderliche Apparatur ist in Abb. 21 schematisch dargestellt.

Vor der Analyse wird die Luft in der Apparatur zunächst durch Kohlendioxyd verdrängt, um einer Knallgasexplosion auf alle Fälle vorzubeugen. Erst dann schaltet man auf Wasserstoff<sup>4</sup> um; man erhitzt den Asbestkasten bis auf 350<sup>0</sup>. Innerhalb einer Stunde ist das zwischen a und b liegende Nickeloxyd zu fein verteiltem Nickel reduziert. Nun trocknet man die Apparatur zu

<sup>1</sup> W. HEMPEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, 30, 202. — Siehe auch POPPENBERG u. STEPHAN: Zeitschr. ges. Schieß- u. Sprengstoffwesen 1909.

<sup>2</sup> H. SIMONIS u. F. H. THIES: Chem.-Ztg. 1912, 36, 917; 1914, 38, 115; 1920, 44, 348.

<sup>3</sup> H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1927.

<sup>4</sup> Der Wasserstoff wird einem Kipp-Apparat (Zink + verdünnte Schwefelsäure) entnommen, zur Reinigung nacheinander durch drei Waschflaschen mit saurer Permanganatlösung, alkalischer Permanganatlösung sowie Silbersulfatlösung geschickt und dann mit Chlorcalcium getrocknet.

Ende, indem man den FLETCHER-Ofen sowie die Flamme bei *G* ansteckt; auch zwischen FLETCHER-Ofen und *B* erhitzt man das Rohr. Bei *A* ist ein durchbohrter Stopfen eingesetzt, um das Eindringen von Luft zu verhindern.

Die Vollständigkeit der Trocknung stellt man fest, indem man bei *A* ein gewogenes Chlorcalciumrohr einsetzt und nach 10 Minuten wägt (Wasserstoff durch trockene Luft verdrängen!). Sobald die Gewichtszunahme nicht mehr als 0,1 mg ausmacht, ist die Apparatur gebrauchsfertig. Die gesamten Vorbereitungen nehmen unter Umständen bis zu 2 Stunden in Anspruch.

Nun schließt man bei *A* die gewogenen drei Absorptionsgefäße an und schiebt von *B* aus das Schiffchen mit Substanz (0,1—0,2 g) so ein, daß keine Luft ins Rohr gelangt. Das Natronkalkrohr hat man mit einem Aspirator verbunden, der den Wasserstoff mit einer Geschwindigkeit von zwei Blasen in der Sekunde durchtreibt. Zwischen *B* und das Schiffchen stellt man eine kleine Flamme, die man allmählich der Substanz nähert. Das Gelingen der Analyse setzt wie bei jeder Elementaranalyse sehr vorsichtiges und langsames Erwärmen voraus. Ist die Substanz vollständig in den glühenden Asbest hineingetrieben, dann erhitzt man sicherheitshalber, bei *B* beginnend, den ganzen herausragenden Teil des Rohres mit der vollen Flamme des Bunsenbrenners; meistens hinterläßt die Substanz Kohle.

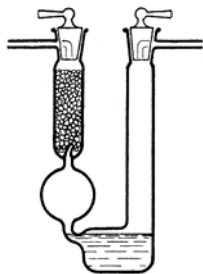


Abb. 22. Chlorcalciumrohr zur gleichzeitigen Absorption von Wasser und Ammoniak.

Nach Beendigung der Hydrierung nimmt man die Absorptionsgefäße ab, verdrängt den in ihnen befindlichen Wasserstoff durch trockene kohlendioxidfreie Luft und wägt. Das gebildete Wasser befindet sich in der Hauptsache im ersten Chlorcalciumrohr; das zweite darf höchstens um einige Zehntel Milligramm zugenommen haben.

$$\text{Berechnung: Prozent Sauerstoff} = \frac{\text{Gewogene Wassermenge}}{\text{Gewicht der Substanz}} \cdot 88,81.$$

Die Ergebnisse stimmen meist bis auf zwei Einheiten in der ersten Dezimale mit der Theorie überein.

Störungen des Verfahrens. Ist Stickstoff zugegen, so entsteht bei der Hydrierung etwas Ammoniak. Es ist zwar meist nur sehr wenig, da das Gas in der Glühzone wieder in die Elemente zerlegt wird, aber doch genug, um die Ergebnisse zu fälschen (im Chlorcalciumrohr zurückgehalten!). Man überwindet diese Schwierigkeit, indem man als erstes Chlorcalciumrohr ein solches besonderer Konstruktion benutzt; es ist unten mit verdünnter Schwefelsäure beschickt. Seine Wirkungsweise bedarf nach der Darstellung in Abb. 22 keiner näheren Ausführungen.

Die Menge des von der Schwefelsäure absorbierten mitgewogenen Ammoniaks ermittelt man durch Titration und zieht das Ergebnis von der gesamten Gewichtszunahme ab; der Rest ist dann das gesuchte Wasser.

Bei Anwesenheit von Schwefel wird zwar dessen größter Teil durch den Katalysator zurückgehalten, ein kleiner Teil aber würde als Schwefelwasserstoff entweichen und im Natronkalkrohr absorbiert werden. Hinter dem Asbestkasten *C* (Abb. 21) schaltet man daher noch einen kürzeren Kasten (10 cm lang) ein und erhitzt diesen bloß auf 150°. Hier wird der Schwefelwasserstoff vom fein verteilten Nickel restlos aufgenommen.

Bei Anwesenheit von Halogenen verfährt man ebenso, erhitzt den zweiten kürzeren Asbestkasten aber nur auf 120°. Das gesamte Halogen wird dabei vom Nickel zurückgehalten. Unter Umständen reicht diese Vorsichtsmaßregel nicht aus. Man schaltet dann als erstes Chlorcalciumrohr ein solches ein, wie es in Abb. 22 dargestellt ist, diesmal aber an Stelle von Schwefelsäure mit Silber-

sulfatlösung beschickt. Durch Zurücktitrieren des überschüssigen Silbers mit Rhodankaliumlösung erfährt man die Menge des gebundenen Halogenwasserstoffes und aus der Differenz gegen die gesamte Gewichtszunahme diejenige des Wassers.

Auch wenn mehrere störende Substanzen anwesend sind, läßt sich meist eine geeignete Arbeitsweise finden.

### c) Bestimmung des Arsens in organischen Substanzen durch Hydrierung.

Während Arsenpentoxyd bzw. -pentasulfid beim vorsichtigen Erhitzen im Wasserstoffstrom nicht reduziert werden, gelingt dies mit den Verbindungen des dreiwertigen Arsens.

Die Substanz (0,05—0,1 g) wird im Schiffchen *a* vergast (Abb. 23) und mit Wasserstoff durch die auf Rotglut erhitzte Asbestmasse *bc* im Quarzrohr *A* geführt. Das Arsen setzt sich unmittelbar hinter der Asbestbeschickung ab.

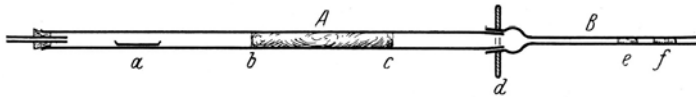


Abb. 23. Apparat zur Bestimmung von Arsen nach H. TER MEULEN und J. HESLINGA.

Es wird nach Beendigung des Versuches durch vorsichtiges Erhitzen in das angeschlossene gewogene Rohr *B* übergetrieben, das bei *e* ein Röllchen Platinblech<sup>1</sup> und bei *f* einen Bausch von ausgeglühtem langfaserigem Asbest trägt; der Asbestreiter *d* schützt das Rohr *B* vor zu starker Erhitzung. Dann läßt man erkalten und wägt das Arsen<sup>2</sup>.

## III. Qualitative und quantitative organische Mikro-Elementaranalyse.

Durch das Vorhandensein von oft nur sehr kleinen Mengen an Analysesubstanz ist man zwangsläufig zur Ausarbeitung mikroanalytischer Arbeitsverfahren geführt worden. Ersparnis an Reagenzien und Zeit sowie vielfach auch eine gewisse Einfachheit der erforderlichen Mittel sind wertvolle Vorteile dieser neu entwickelten Arbeitsweise. Nimmt man hinzu, daß die Ergebnisse im allgemeinen mindestens ebenso zuverlässig und genau sind wie diejenigen der Makromethoden, dann versteht man, daß diesen Verfahren in der modernen Chemie eine grundsätzlich wichtige Rolle zukommt.

Über die qualitative Mikro-Elementaranalyse wurde bei Besprechung der analytischen Arbeitsverfahren (S. 566 f.) schon kurz berichtet. Es handelt sich dabei meist um an und für sich bekannte Nachweise, die man unter mikrochemischen Gesichtspunkten in zweckmäßiger Weise auf sehr kleine Mengen (bis herunter zu wenigen Zehntel, ja Tausendstel Milligramm) anwendbar gemacht hat. Nähere Angaben mögen dem schon erwähnten Buche von F. EMICH<sup>3</sup> entnommen werden.

Was die quantitative Mikro-Elementaranalyse anlangt, so leuchtet ohne weiteres ein, daß sich bei den geringen Einwaagen an Substanz alle Fehlerquellen am Ergebnis sehr stark auswirken. Stellt schon die gewöhnliche Elementaranalyse ein Verfahren dar, dessen Durchführung sich nicht nach einem

<sup>1</sup> Platin absorbiert im glühenden Zustande erhebliche Mengen von Arsen, die durch Glühen an der Luft wieder abgegeben werden.

<sup>2</sup> Für die Bestimmung des Quecksilbers in organischen Substanzen kann man eine ähnliche Arbeitsvorschrift heranziehen.

<sup>3</sup> F. EMICH: Mikrochemisches Praktikum, 2. Aufl. München: J. F. Bergmann 1931.

allgemein gültigen Schema erzwingen läßt, sondern bei dem die Erfahrung und Geschicklichkeit des Analytikers ein wichtiger Faktor sind, so gilt dies um so mehr für die mikroanalytischen Methoden. Ihren Ausbau verdankt man vor allem F. PREGL<sup>1</sup> und seinen Mitarbeitern. Wirkliches experimentelles Vertrautsein mit allen analytischen Behelfen und Handgriffen sowie ein scharfer kritischer Blick sind unerläßliche Voraussetzung für das erfolgreiche Arbeiten nach diesen Verfahren.

Zur Milderung der oft übergroßen Empfindlichkeit<sup>2</sup> dieser Methoden (Einswaage von nur 2—3 mg) hat man vorgeschlagen, die Arbeitsweise nach F. PREGL auf Anwendung einer etwas erhöhten Menge Analysesubstanz umzustellen. Von den mannigfachen Anregungen in dieser Richtung zum Ausbau einer vereinfachten Elementaranalyse bzw. zum Arbeiten im Halbmikromaßstab (10 bis 30 mg Substanz) seien hier nur die wichtigsten Literaturstellen<sup>3</sup> angegeben.

Die nachstehenden Ausführungen beschränken sich, da es hier nicht Aufgabe sein kann, eine Anleitung für die Mikro-Elementaranalyse zu geben, auf die Erörterung der wichtigsten Gesichtspunkte unter Anlehnung an die bewährten Angaben von F. PREGL.

#### a) Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff.

Die Methode beruht wie das Makroverfahren auf der vollständigen Verbrennung der Analysesubstanz zu Kohlendioxyd und Wasser.

Die für die Verbrennung erforderlichen Gase, Luft und Sauerstoff, müssen von sichergestellter Reinheit sein. Sie werden je einem Gasometer entnommen und gehen über Gummischläuche<sup>4</sup> zunächst durch einen Druckregler. Dahinter werden die Sauerstoff- und die Luftleitung mittels eines Dreiweghahnes vereinigt und durch einen mit darauffolgendem Chlorcalciumrohr zusammengesetzten Blasenähler<sup>5</sup> mit Kalilauge geführt. Eine mit dickwandigem Schlauch angesetzte, etwa 5 cm lange Thermometercapillare stellt, mit durchbohrtem Gummistopfen eingepaßt, die Verbindung mit dem Verbrennungsrohr her, das etwa 45 cm lang ist und 1 cm im Durchmesser hat. Es besteht am besten aus Supremaxglas. Auf der einen Seite soll es einen 2 cm langen Schnabel mit einem Rohr von etwa 2 mm lichter Weite haben (Abb. 24). Die in Abb. 24 dargestellte Universalfüllung dient zur Analyse beliebig zusammengesetzter Stoffe.

Vor der ersten Verbrennung wird das Rohr 8—10 Stunden lang im Luft- oder Sauerstoffstrom ausgeglüht; man verbrennt dann im Blindversuch einige Milligramm einer organischen Substanz.

<sup>1</sup> F. PREGL: Die quantitative organische Mikroanalyse, 3. Aufl. Berlin: Julius Springer 1930.

<sup>2</sup> Vgl. M. BOETIUS: Über die Fehlerquellen bei der mikroanalytischen Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs nach der Methode von FRITZ PREGL. Berlin: Verlag Chemie G. m. b. H. 1931. — J. SINDNER: Fehlerquellen in der organischen Elementaranalyse. Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, **59**, 2561, 2806; 1927, **60**, 124; 1930, **63**, 949, 1123, 1396, 1672; 1931, **64**, 1560; 1932, **65**, 1696.

<sup>3</sup> J. v. DUBSKY: Vereinfachte quantitative Mikroelementaranalyse organischer Substanzen. Leipzig: Veit & Co. 1917. — Vgl. ferner E. BEEL u. Mitarbeiter: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, **59**, 890; 1928, **61**, 83; 1932, **65**, 978. — H. BERGER: Journ. prakt. Chem. 1932, (N. F.) **133**, 1. — T. OSUKA: Eine Halbmikromethode zur Kohlenstoffbestimmung in biologischen Flüssigkeiten. Biochem. Zeitschr. 1932, **244**, 284. — L. ORTHNER u. L. REICHEL: Organisch-chemisches Praktikum, S. 238f. Berlin: Verlag Chemie G. m. b. H. 1929. — SUCHALDA u. BOBRANSKI: Halbmikromethode zur automatischen Verbrennung organischer Substanzen. Braunschweig: Vieweg & Sohn 1929.

<sup>4</sup> Auf ihre einwandfreie Beschaffenheit ist größter Wert zu legen; nötigenfalls führt man eine künstliche Alterung durch.

<sup>5</sup> Der Blasenähler muß geeicht werden, d. h. man ermittelt das einer bestimmten Blasenzahl entsprechende Gasvolumen.

An das Verbrennungsrohr schließen sich die Absorptionsgefäße aus dünnem Glase an, denen F. PREGEL röhrenförmige Gestalt (Abb. 25) gegeben hat; ihr eingeschliffener Glasstöpsel ist mit Glaskitt nach KRÖNIG eingedichtet. Unter Einhalten entsprechender Vorsichtsmaßregeln<sup>1</sup> füllt man das eine Rohr zur Wasseraufnahme mit hirsekorngroßem getrocknetem Chlorcalcium, das andere

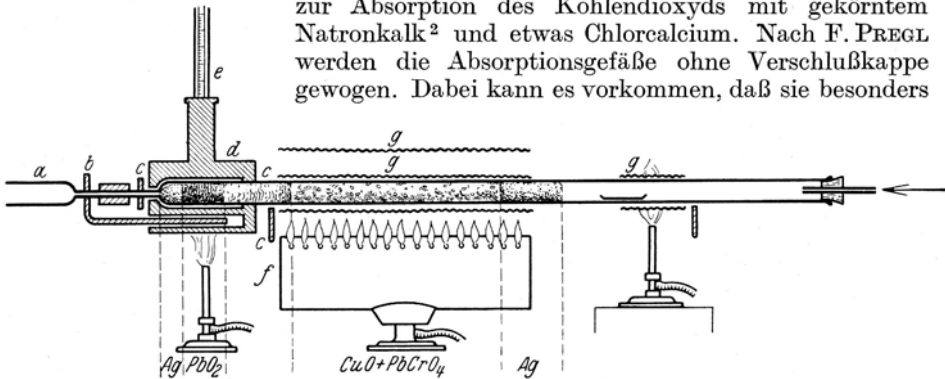


Abb. 24. Verbrennungsrohr nach F. PREGEL.

*a* Chlorcalciumrohr, *b* Kupferbügel, *c* Asbestscheibe bzw. -wicklung, *d* Hohlgranate, *e* Steigrohr der Hohlgranate, *f* Langbrenner, *g* Drahtnetzrolle bzw. Drahtnetzunnel. Die Beschickung des Verbrennungsrohres ist nach Art der Substanzen und ihrer Schichtlänge durch die gestrichelten Lote mit der chemischen Bezeichnung angegeben.

an schwülen Tagen mit hoher Luftfeuchtigkeit eine nicht genügende Gewichtskonstanz zeigen. Diesen Nachteil vermeiden A. BLUMER sowie B. FLASCHENTRÄGER durch Anwendung verschließbarer Rohre.

Die Absorptionsgefäße werden untereinander wie auch mit dem Schnabel des Verbrennungsrohres durch kurze Gummistücke aus Druckschlauch verbunden. Das Natronkalkrohr ist nach außen gegen die Luft durch ein Sicherheitschlorcalciumrohr abgeschlossen.

Die Verbrennung ist so zu leiten, daß 3—4, höchstens 5 ccm Gas in der Minute durch das Rohr streichen<sup>3</sup>. Man glüht zunächst 1 Stunde im Luftstrom aus, indem man die Füllung mittels des Langbrenners auf dunkle Rotglut bringt.

Die Hohlgranate (Abb. 24) wird so erwärmt, daß ihre Flüssigkeit im Sieden bleibt; den leeren Teil des Rohres glüht man mit einem Bunsen-

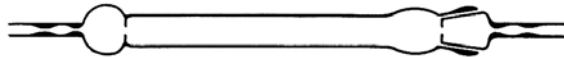


Abb. 25. Absorptionsapparat nach F. PREGEL.

brenner aus. Die Gasströmungsgeschwindigkeit wird geregelt. Nun bereitet man die Absorptionsapparate vorschriftsmäßig vor und wägt die Substanz im Platin- oder Porzellanschiffchen ab. Wenn man mit nur 3—5 mg arbeitet, muß man sich hierzu einer Mikrowaage (z. B. nach Dr. W. H. F. KUHLMANN-Hamburg) bedienen, arbeitet man im Halbmikromaßstab (10—30 mg), dann genügt eine empfindliche analytische Waage<sup>4</sup>. Flüssigkeiten wägt man in Capillaren ab.

<sup>1</sup> Einzelheiten bei F. PREGEL: Die quantitative organische Mikroanalyse, 3. Aufl. Berlin: Julius Springer 1930; ferner bei H. LIEB: Die quantitative mikrochemische Elementaranalyse. In G. KLEINs Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 1, S. 149. Wien: Julius Springer 1931.

<sup>2</sup> Hierfür eignet sich auch das unter dem Namen „Natronasbest“ im Handel befindliche Präparat (E. MERCK-Darmstadt).

<sup>3</sup> Eichung mit einer MARIOTTE-Flasche.

<sup>4</sup> Bei hygroskopischen Substanzen nimmt man besondere Wägegäßen.

Die abgewogenen Absorptionsapparate werden, Schliffende auf Schliffende, durch Druckschlauch verbunden und gasdicht wieder mittels eines Druckschlauches am Schnabel des Verbrennungsrohres angesetzt; das Natronkalkrohr bzw. das dahinter geschaltete Chlorcalciumrohr wird mit der MARIOTTE-Flasche zur Gasdruckregelung verbunden. Von der andern Seite des Verbrennungsrohres her führt man das Schiffchen ein; es soll etwa 3—7 cm von der Silberschicht entfernt bleiben. Man verschließt mit dem Gummistopfen und drückt durch dessen Bohrung die Capillare ein. Dann schaltet man mit dem Dreiweghahn die Zufuhr von Sauerstoff ein und regelt sie durch die MARIOTTE-Flasche. Mit dem Langbrenner wird auf dunkle Rotglut erhitzt.

Die Substanz wird in etwa 10 Minuten verbrannt, indem man sich mit dem Bunsenbrenner (Abb. 24) allmählich von rechts her der Substanz nähert, fortschreitend bis an den Langbrenner. Dann schaltet man auf Zuleitung von Luft um und glüht den leeren Rohrteil sicherheitshalber nochmals systematisch aus. Gleichzeitig sorgt man dafür, daß das etwa kondensierte Wasser vollständig in das Chlorcalciumrohr gedrängt wird. Das Übertreiben der Verbrennungsprodukte ist beendet, wenn man 100 ccm Luft durchgeleitet hat. Nun löst man die Verbindungen, wischt die Absorptionsgefäße erst feucht mit einem Flanellläppchen, dann trocken mit einem Rehleder ab und bestimmt ihr Gewicht nach 10 Minuten langem Stehen neben der Waage. Das Schiffchen wägt man zur Ermittlung einer allenfallsigen „Asche“ immer zurück. Die gefundenen Werte liegen bei gelungener Analyse meist 0,1—0,2% zu hoch.

Hier sei noch kurz erwähnt, daß man auch für die Ermittlung des Kohlenstoffs durch Oxydation auf nassem Wege mikroanalytische Arbeitsweisen angegeben hat; vgl. hierzu M. NICLOUX<sup>1</sup> bzw. A. BOIVIN sowie H. LIEB und H. G. KRAINICK<sup>2</sup>.

### b) Bestimmung des Stickstoffs nach DUMAS.

Die Anwendung des DUMAS-Verfahrens auf sehr kleine Substanzmengen ist bei Benutzung entsprechender apparativer Hilfsmittel ohne weiteres möglich. Es ist ein Kipp-Apparat erforderlich, der reines, luftfreies Kohlendioxyd in „Mikroblasen“ zu entnehmen ermöglicht<sup>3</sup>. Das Verbrennungsrohr, unter Umständen aus Quarz hergestellt, ist in einer Schicht von etwa 14 cm Länge mit reinem drahtförmigem Kupferoxyd („zur Analyse“) gefüllt und gegen den Schnabel des Rohres zu durch etwas Asbest abgeschlossen. Diese „bleibende Füllung“ grenzt man nach innen wieder durch einen Asbestbausch oder durch eine Kupferdrahtnetzrolle ab. Man glüht zuerst im Sauerstoffstrom aus und reduziert dann unter Durchleiten von Wasserstoff eine 3—4 cm lange Schicht zu metallischem Kupfer<sup>4</sup>. Nun wird in einer Länge von etwa 10 cm frisch ausgeglühtes drahtförmiges Kupferoxyd aufgefüllt, das in einer 1 cm langen Schicht von feinem Kupferoxydpulver seinen Abschluß findet. Ein zweimal rechtwinklig gebogenes englumiges Glasrohr verbindet den Kipp-Apparat mit dem Verbrennungsrohr. Sein Schnabel ist gasdicht durch ein Rohr mit Feinregulierhahn mit dem Präzisions-Mikroazotometer nach F. PREGL verbunden. Das Stickstoffvolumen wird über 50% iger Kalilauge abgelesen; letztere wird durch Fällung des darin enthaltenen Carbonats mittels Bariumhydroxyds schaumfrei gemacht.

<sup>1</sup> M. NICLOUX: Compt. rend. Soc. Biologie 1929, 100, 273; Bull. Soc. Chim. biol. 1929, 11, 1269.

<sup>2</sup> H. LIEB u. H. G. KRAINICK: Mikrochemie 1931, 9, 367. — Vgl. auch H. LIEB: Die quantitative mikrochemische Elementaranalyse. In G. KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 1, S. 183f. Wien: Julius Springer 1931.

<sup>3</sup> Vgl. hierzu auch FR. HEIN: Zeitschr. angew. Chem. 1927, 40, 864.

<sup>4</sup> Man kann auch das reduzierte Kupfer unmittelbar auf die dann nur 10 cm lange Kupferoxydschicht auffüllen.

Zur Analyse werden aus dem zurückzuwägenden Wägeröhrchen 2—4 mg Substanz in das Mischröhrchen gegeben, hier mit etwa 2 ccm ausgeglühtem Kupferoxydpulver gründlich vermischt und dann mit dem Fülltrichter verlustfrei in das Verbrennungsrohr gefüllt unter mehrmaligem Nachspülen mit Kupferoxydpulver<sup>1</sup>.

Die eigentliche Verbrennung vollzieht sich unter Durchleiten von luftfreiem Kohlendioxyd und Einhaltung der vorgeschriebenen Vorsichtsmaßregeln in üblicher Weise; Dauer der Analyse etwa 35—45 Minuten. Eine Viertelstunde nach dem Abnehmen des Azotometers liest man das Stickstoffvolumen ab. Berechnung wie sonst; die Werte liegen meist 0,1—0,2% zu hoch.

#### c) Bestimmung des Stickstoffs nach KJELDAHL.

Man zersetzt in einem KJELDAHL-Kolben aus Hartglas von der Dimension eines größeren Reagensglases etwa 3—5 mg Substanz<sup>2</sup> mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 1 Messerspitze eines Gemisches aus 1 Teil Kupfersulfat und 3 Teilen Kaliumsulfat. Nachdem unter Erhitzen 2—3 Minuten lang Schwefeltrioxyd entwichen ist, setzt man 2—3 Tropfen chemisch reines Perhydrol „Merck“ zu und heizt unter Wiederholung des Perhydrolzusatzes bis zur vollständigen Zersetzung an. Sie ist meist nach 10—15 Minuten erreicht; bei gewissen Substanzen ist es vorteilhafter, an Stelle von Kupfersulfat etwas Quecksilbersulfat zuzusetzen.

Der mit 2—3 ccm Wasser verdünnte Aufschluß wird in der von PARNAS und WAGNER angegebenen Destillationsapparatur (vgl. hierzu Abb. 13) der üblichen Ammoniakdestillation unterworfen. Man legt einen Überschuß von 0,01 N-Salzsäure vor, die in einer Mikrobürette abgemessen wird; zum Zurücktitrieren dient eine carbonatfreie 0,01 N-Natronlauge; Methylrot als Indicator.

#### d) Bestimmung der Halogene, des Schwefels, des Phosphors.

Halogene bestimmt man mikroanalytisch entweder nach CARIUS im geschlossenen Rohr durch Zerstörung mit Salpetersäure bei Gegenwart von Silbernitrat oder unter Durchleiten von Sauerstoff im Spiralen- (Perlen-) Rohr nach F. PREGL. Zum Abfiltrieren und zur Wägung der kleinen Mengen von Halogensilber hat dieser Analytiker ein besonderes Filterröhrchen sowie eine Absaugvorrichtung angegeben.

Der Aufschluß nach CARIUS wird mit einer Einwaage von 5—7 mg Substanz ausgeführt, die in einer Glascapillare abgewogen wird. Das „Bombenrohr“ ist ein 20 cm langes und 1 cm weites Hartglasrohr, das unter Bildung einer dickwandigen Capillare zugeschmolzen und dann im „Schießofen“ oder in einem Kupferblech 3—6 Stunden auf 240—260° (selten höher) erhitzt wird. Der Halogenniederschlag wird auf das Filterröhrchen gebracht und nach entsprechender Vorbereitung gewogen.

Bei der Bestimmung mit dem Perlen- oder Spiralenrohr, wegen deren genauen Durchführung auf die Originalliteratur verwiesen sei, werden die Verbrennungsprodukte in halogenfreier Natriumcarbonatlösung aufgefangen.

<sup>1</sup> Flüssigkeiten wägt man in einer Glascapillare ab, umhüllt diese mit einem frisch ausgeglühten Kupferdrahtnetzröllchen, bricht die Spitze ab und schiebt dann in die Verbrennungsröhre ein.

<sup>2</sup> Unter Umständen ist es zweckmäßig, die Substanz zu Pastillen zu formen. — Um auch solche Substanzen nach KJELDAHL behandeln zu können, bei denen, wie z. B. bei Hydrazin-, Nitro-, Nitroso- und Azo-Verbindungen, ein verlustloser Aufschluß direkt nicht möglich ist, macht A. FRIEDRICH (Zeitschr. physiol. Chem. 1933, 216, 68) den Vorschlag, vor der eigentlichen Zersetzung eine Reduktion mit Jodwasserstoffsäure vorzunehmen.



Nebenher entstehen auch Halogenate in kleiner Menge, die man mittels Natriumsulfatlösung wieder zum Halogenid reduziert.

Hier sei ferner die mikroanalytische Ermittlung des Jods kurz erwähnt. Diese Aufgabe spielt neuerdings, seit man das Jod als biogenes Element erkannt hat, in der Physiologie und Lebensmittelchemie eine wichtige Rolle. Zu seiner Bestimmung arbeitet man meist im geschlossenen System, wobei verschiedene Verfahren entwickelt worden sind<sup>1</sup>. Nach der Zersetzung der Substanz überführt man das Jodid mittels Chlor- oder Bromwassers ins Jodat und treibt das überschüssige Oxydationsmittel durch Erhitzen der Reaktionsflüssigkeit aus. Hernach setzt man eine frisch bereitete Lösung von Kaliumjodid zu und titriert das ausgeschiedene Jod mit 0,01 N-Natriumthiosulfatlösung zurück. Gemäß der nachstehenden Umsetzung entfällt ein Sechstel des ermittelten Jodes auf die Analysesubstanz:



Schwefel. Seine mikroanalytische Ermittlung ist derjenigen der Halogene sehr ähnlich. Man arbeitet entweder nach CARIUS im geschlossenen Rohr oder durch Verbrennen im Perlenrohr. Die Wägung erfolgt als Bariumsulfat in einem Mikro-NEUBAUER-Platintiegel; wegen der Einzelheiten sei auf die Originalliteratur verwiesen.

Phosphor<sup>2</sup>. Man oxydiert die Substanz im Zersetzungskolben nach KJELDAHL (je nach dem Phosphorgehalt 5—20 mg) am besten mit einem Gemisch aus Salpetersäure und Schwefelsäure (0,5 ccm konzentrierte Schwefelsäure und einige Tropfen konzentrierte Salpetersäure). Es wird zunächst bis zum Auftreten von Schwefeltrioxyd erhitzt. Dann läßt man erkalten, gibt nochmals etwas Salpetersäure oder auch Perhydrol oder etwas gepulvertes Kaliumnitrat zu und fährt so fort, bis eine Veränderung der klaren Reaktionsflüssigkeit nicht mehr erfolgt.

Die Oxydation der Substanz läßt sich auch mit einem Gemisch aus Natriumcarbonat und Salpeter durch Schmelzen im Sauerstoffstrom ausführen.

Zum Aufschluß gibt man etwas Wasser, setzt 2 ccm eines Gemisches<sup>3</sup> von Salpetersäure und Schwefelsäure zu und verdünnt dann mit Wasser auf ein Volumen von 15 ccm. Man stellt ins siedende Wasserbad. Nach dem Herausnehmen wird mit 15 ccm eines vorgeschriebenen Ammoniumsulfat-Molybdänreagens<sup>4</sup> gefällt. Nach 2—3stündigem Stehen (bei wenig Phosphor bis zu 18 Stunden ausdehnen) ist die Phosphorsäure als Molybdat ausgefallen. Man bestimmt sie entweder gravimetrisch auf dem Filterröhrchen nach F. PREGL oder maßanalytisch. Zu letzterem Zwecke wird der Niederschlag dekantierend von der Flüssigkeit abgetrennt, mit wenig eiskaltem 50%igem Alkohol gewaschen und dann mit einem gemessenen Überschuß von 0,1 N-Alkalilauge erhitzt, bis das Ammoniak vollständig vertrieben ist. Man titriert mit 0,1 N-Salzsäure zurück;

<sup>1</sup> TH. LEIPERT: Mikrochemie. PREGL-Festschrift 1929, S. 266. — TH. VON FELLEBERG u. M. STEINER: Das Jod. Der qualitative Nachweis und die quantitative Bestimmung von Jod in organischem und organisiertem Material. Mikrochemie 1929, 7, 242. — J. SCHWAIBOLD u. B. HARDER: Biochem. Zeitschr. 1931, 240, 441. — G. PFEIFFER: Biochem. Zeitschr. 1931, 231, 244. — J. F. REITH: Biochem. Zeitschr. 1930, 224, 237.

<sup>2</sup> Vgl. hierzu auch R. STREBINGER u. H. K. BARRENSCHEEN: Mikrochemie 1929, 7, 119, 127.

<sup>3</sup> 30 ccm Schwefelsäure zu 11 Salpetersäure (etwa 32%ig).

<sup>4</sup> 50 g Ammoniumsulfat werden in einem Literkolben mit 500 ccm Salpetersäure (Spezifisches Gewicht 1,36) versetzt. Man löst außerdem 150 g zerriebenes Ammoniummolybdat in 400 ccm siedendem Wasser auf. Letztere Lösung gießt man nach dem Erkalten in dünnem Strahl in die erstere und füllt dann zum Liter auf. Nach zweitägigem Stehen filtriert man in eine braune Flasche und bewahrt dunkel und kühl auf.

Phenolphthalein oder Thymolphthalein als Indicator. Der Reaktionsgleichung gemäß entspricht 1 Atom Phosphor 28 Äquivalenten Alkalilauge, also 1 ccm 0,1 N-Alkalilauge = 0,1108 mg Phosphor<sup>1</sup>.

#### Buch-Literatur.

M. DENNSTEDT: Anleitung zur vereinfachten Elementaranalyse, 4. Aufl. Hamburg: O. Meißners Verlag 1919. — F. EMICH: Mikrochemisches Praktikum, 2. Aufl. München: J. F. Bergmann 1931. — L. GATTERMANN: Die Praxis des organischen Chemikers, 23. Aufl., bearbeitet von H. WIELAND. Berlin u. Leipzig: W. de Gruyter & Co. 1933. — H. LIEB: Die quantitative mikrochemische Elementaranalyse. In G. KLEINs Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 1, Allgemeine Methoden der Pflanzenanalyse, S. 149. Wien: Julius Springer 1931. — H. TER MEULEN u. J. HESLINGA: Neue Methoden der organisch-chemischen Analyse. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H. 1927. — F. PREGL: Die quantitative organische Mikroanalyse, 3. Aufl. Berlin: Julius Springer 1930. — H. SIMONIS: Organische Elementaranalyse. In J. HOUBEN: Die Methoden der organischen Chemie, 3. Aufl., Bd. 1, Allgemeiner Teil, S. 3. Leipzig: Georg Thieme 1925.

<sup>1</sup> Nach TH. VON FELLEBERG (Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 205) entspricht bei der acidimetrischen Titration des nach VON LORENZ gefällten Phosphor-Molybdän-Niederschlags 1 ccm 0,1 N-Natronlauge = 0,1080 mg Phosphor.

# Stickstoffverbindungen.

Von

Professor **DR. A. BÖMER**-Münster i. W.

Mit 10 Abbildungen.

Die Stickstoffverbindungen werden hier nur insoweit behandelt, als sie in Lebensmitteln mehr oder weniger allgemein verbreitet vorkommen, nämlich die Proteine, deren bei der Hydrolyse entstehende Aminosäuren und die Amine, ferner Ammoniak, Salpetersäure und Salpetrige Säure.

Die sonstigen, nur in einzelnen Lebensmitteln vorkommenden Stickstoffverbindungen werden bei den betreffenden Lebensmitteln behandelt, z. B. Kreatin und Kreatinin bei Fleisch (Bd. III), Theobromin und Coffein bei den alkaloidhaltigen Genußmitteln (Bd. VI); über die Alkaloidgifte siehe unten (S. 1321) unter „Ausmittelung der Gifte“.

## I. Proteine.

Über die Eigenschaften und Reaktionen der Proteine siehe Bd. I, S. 138.

Vielfach begnügt man sich bei der Lebensmittelanalyse damit, die Proteine aus dem Gesamt-Stickstoff der Substanz durch Multiplikation mit 6,25 (S. 606) zu berechnen, weil die Hauptmenge der Stickstoffverbindungen der meisten Lebensmittel aus Proteinen besteht. Da aber neben diesen in manchen Lebensmitteln auch noch mehr oder weniger Stickstoffverbindungen nichtproteinartiger Natur vorkommen, bezeichnet man die durch Multiplikation des Gesamt-Stickstoffs mit 6,25 erhaltenen Werte, falls die Menge der Stickstoffverbindungen nichtproteinartiger Natur nur verhältnismäßig gering ist, als Rohprotein und bei einem größeren Gehalt an solchen als „Stickstoffsubstanz“.

Handelt es sich darum, lediglich die Stickstoffverbindungen proteinartiger Natur zu erfassen, so trennt man diese von den anderen Stickstoffverbindungen und bezeichnet die so gefundenen Werte als Reinprotein.

Will man sich ferner ein Urteil über die Verdaulichkeit der Stickstoffverbindungen bilden, so bestimmt man diejenigen von ihnen, welche im künstlichen Verdauungsversuch mit Pepsin von diesem gelöst werden. Sofern hierbei die wasserlöslichen Stickstoffverbindungen nichtproteinartiger Natur eingeschlossen werden, bezeichnet man die erhaltenen Werte für die verdauten Stickstoffverbindungen als verdauliches Rohprotein (verdauliche Stickstoffsubstanz) oder, wenn nur die verdaulichen Stickstoffverbindungen proteinartiger Natur zum Ausdruck kommen sollen, als verdauliches Reinprotein, früher vielfach auch als verdauliche Eiweißstoffe oder als verdauliches Eiweiß bezeichnet.

## A. Nachweis der Proteine.

Zum Nachweise der Proteine bzw. der Reinproteine dienen sowohl Fällungsreaktionen als auch besonders Farbenreaktionen, ferner zur Unterscheidung der Proteine verschiedener Tier- und Pflanzenarten serologische Methoden (S. 670).

## 1. Fällungsreaktionen.

Bei den zahlreichen Fällungsreaktionen für in Wasser, Alkohol und verdünnten Salzlösungen lösliche Proteine kommen die Fällung durch Erhitzung (Gerinnung), Aussalzung und vorwiegend durch folgende Fällungsmittel zur Anwendung:

a) **Erhitzung (Gerinnung).** Die in kaltem Wasser löslichen Albumine (Bd. I, S. 219) und die in verdünnten Salzlösungen löslichen Globuline (Bd. I, S. 221) scheiden sich beim Erhitzen aus ihren Lösungen flockig aus (Gerinnung). Die Gerinnungstemperatur ist wesentlich abhängig vom Salzgehalt der Lösung; wenn kein Salz vorhanden ist, gerinnen manche Proteine auch in der Siedehitze nicht<sup>1</sup>.

K. MICKO<sup>2</sup> untersucht daher zur Unterscheidung der verschiedenen Albumine und Globuline nach ihrem Gerinnungspunkt in zu 50 und 25% (Albumine) bzw. 25 und 12,5% (Globuline<sup>3</sup>) mit Ammoniumsulfat gesättigten Lösungen, indem er die zu untersuchende Proteinlösung mit dem gleichen bzw. doppelten und vierfachen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung vermischt. Er unterscheidet einen unteren (Beginn der Trübung) und oberen Gerinnungspunkt (Ausscheidung eines feinflockigen Niederschlages). Zur Bestimmung der Gerinnungspunkte können zwar auch die ursprünglichen Proteinlösungen verwendet werden, besser ist es aber, dafür wäßrige Lösungen der durch Sättigen mit Ammoniumsulfat ausgesalzenen und nach dem Abfiltrieren mit  $\frac{9}{10}$ -gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgewaschenen Proteine zu verwenden, da diese hierdurch von anderen Stoffen befreit werden und in bestimmten Konzentrationen angewendet werden können.

Bei der Bestimmung der Gerinnungspunkte muß die Erhitzung gleichmäßig und langsam erfolgen; zu ersterem Zwecke bedient man sich eines zweiten, in das äußere mit Wasser gefüllte Gefäß eingestellten Thermometers. K. MICKO fand für 0,2%ige<sup>4</sup> und konzentriertere Lösungen folgende unteren (u. G.-P.) und oberen Gerinnungspunkte (o. G.-P.):

| Protein                           | 50%ige Ammoniumsulfat-Sättigung |                  |                   | 25%ige Ammoniumsulfat-Sättigung |                  |                   |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|------------------|-------------------|
|                                   | u. G.-P.<br>Grad                | o. G.-P.<br>Grad | Differenz<br>Grad | u. G.-P.<br>Grad                | o. G.-P.<br>Grad | Differenz<br>Grad |
| 1. Ursprüngliche Proteine:        |                                 |                  |                   |                                 |                  |                   |
| Eieralbumin . . . .               | 68—69                           | 71—72            | 2,5—3             | 68                              | 68—69,5          | 1                 |
| Milchalbumin <sup>4</sup> . . . . | 68,5—69                         | 76—78            | 9                 | 90                              | 95               | 5                 |
| Serumalbumin . . . .              | 65—69                           | 74—76            | 6—9               | 74—76                           | 80—81            | 5—6               |
| 2. Ausgesalzene Proteine:         |                                 |                  |                   |                                 |                  |                   |
| Eieralbumin . . . .               | 65—66,5                         | 68—70            | 3,5—4             | 64,7—66                         | 66—68            | 1,3—2             |
| Milchalbumin . . . .              | 40—44,5                         | 46,5—52          | 4—7,5             | 70,5—72,5                       | 78—80,5          | 7,5—8             |
| Serumalbumin . . . .              | 55—56                           | 71,5—73          | 15,5—17           | 63—72                           | 77—78            | 6—14              |
| Serumglobulin . . . .             | 25%ige Sättigung                |                  |                   | 12,5%ige Sättigung              |                  |                   |
|                                   | 57—63                           | 66,5—73          | 9,5—13            | 60—64                           | 73—74            | 10—13             |

Hiernach lassen sich Eier-, Milch- und Muskelalbumin sowie Muskelserumglobulin durch ihre Gerinnungspunkte unterscheiden, wobei natürlich die ursprünglichen und die durch Aussalzen gereinigten Proteine je für sich verglichen werden müssen.

b) **Aussalzung.** Zur Aussalzung von wasserlöslichen Proteinen kommen namentlich Natriumchlorid, -sulfat, -nitrat und -acetat, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und -nitrat, und vor allem Ammonium- und Zinksulfat in Frage. Zum Nachweise der Aussalzbarkeit versetzt man die Proteinlösung mit einem

<sup>1</sup> Mit dem Problem der Gerinnung haben sich H. LÜERS und M. LANDAUER (Zeitschr. angew. Chem. 1922, 35, 469) beschäftigt.

<sup>2</sup> K. MICKO: Z. 1910, 20, 537; 1911, 21, 646.

<sup>3</sup> Bei der Untersuchung der Globuline ist eine zu 50% mit Ammoniumsulfat gesättigte Lösung nicht anwendbar, weil die Globuline bei einer solchen Salzkonzentration ausgesalzen werden.

<sup>4</sup> Die ursprüngliche Milchalbuminlösung enthielt bei der 50%igen Sättigung nur 0,10% und bei der 25%igen Sättigung nur 0,05% Milchalbumin.

mehr oder minder großen Überschuß der gesättigten wäßrigen Salzlösung. Über die Aussalzung zur Bestimmung der Proteosen siehe S. 611.

c) **Alkohol und Aceton.** Die meisten wasserlöslichen Proteine werden aus ihren neutralen und schwach sauren — nicht aus alkalischen — Lösungen, namentlich bei Gegenwart von Salzen, durch Alkohol und Aceton gefällt. Die Fällung mit Alkohol kann auch unter gewissen Bedingungen zur Bestimmung von Proteinen dienen (S. 609). Eine Ausnahme machen die Prolamine der Getreidearten (Bd. I, S. 224), die in Alkohol-Wasser-Mischungen bestimmter Konzentration löslich sind.

Die Reaktion ist für Proteine nicht eindeutig, da auch andere Stoffe, z. B. Dextrine, aus wäßrigen Lösungen durch Alkohol und Aceton ausgeschieden werden.

d) **Mineralsäuren.** Salpeter-<sup>1</sup>, Salz-, Schwefel- und Metaphosphorsäure wirken fällend auf wasserlösliche Proteine. Die Fällungen sind meist im Überschusse der Säuren unter Denaturierung der Proteine löslich. Eine zur Fällung besonders geeignete Säure ist Ferrocyanwasserstoffsäure (Kaliumferrocyanid + Essigsäure): Zu 10 ccm der kalten Lösung gibt man 10 Tropfen 20%ige Essigsäure und einige Tropfen 10%ige Ferrocyankaliumlösung. Bei Gegenwart von Albumin entsteht eine Fällung; es lassen sich damit noch 0,001% Albumin im Harn nachweisen.

e) **Metallsalze.** Fällungen wasserlöslicher Proteine entstehen namentlich durch wäßrige Quecksilber-, Blei-, Zinn-, Kupfer- und Eisensalze — die Fällungen sind meist im Überschuß der Salze löslich —, ferner durch die Salze der Phosphormolybdän- und Phosphorwolframsäure, durch Jod-Jodkalium und komplexe Jodverbindungen wie Quecksilber- und Wismutjodidjodkalium.

f) **Organische Säuren.** Pikrinsäure, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure,  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure, Gerbsäure.

Besonders zum Nachweise von wasserlöslichen Proteinen geeignet sind:

$\alpha$ ) **ESBACHS Reagens.** Es enthält 1 g Pikrinsäure und 2 g Citronensäure, zu 100 ccm mit Wasser gelöst. Die zu untersuchende Lösung (z. B. Harn) wird mit Essigsäure angesäuert und mit dem Reagens versetzt. Bei Gegenwart von Protein (Albumin) tritt eine flockige Ausscheidung ein<sup>2</sup>.

$\beta$ ) **Sulfosalicylsäure**<sup>3</sup>. Man verwendet eine 20%ige wäßrige Lösung. Bei den geringsten Mengen Protein (z. B. Albumin im Harn) tritt eine Trübung ein. Eine durch Proteosen verursachte Trübung löst sich beim Erwärmen.

$\gamma$ ) **Gerbsäure.** Nach A. KOSSEL und F. WEISZ<sup>4</sup> verwendet man eine wäßrige Lösung, welche 7 g Gerbsäure, 5 ccm Eisessig und 10 g Natriumchlorid in 100 ccm enthält.

Ein colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von wasserlöslichem Protein mit  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure hat E. RIEGLER<sup>5</sup> angegeben. Es beruht auf der Löslichkeit des Kupferhydroxyds in alkalischer Proteinlösung.

## 2. Farbenreaktionen.

Die Farbenreaktionen der Proteine sind schon zum Teil in Bd. I, S. 140 bis 142, namentlich hinsichtlich ihres Wesens und ihrer allgemeinen Ausführungsform, beschrieben worden. Hier seien ergänzend einige vorwiegend in rein

<sup>1</sup> Vgl. F. MICHEL: Chem.-Ztg. 1911, 35, 183.

<sup>2</sup> Nach H. LABBÉ und R. MAGUIN (Compt. rend. Paris 1913, 156, 1415; Z. 1916, 32, 503) ist ein beträchtlicher Überschuß an Pikrinsäure erforderlich.

<sup>3</sup> TH. BUDDÉ (Apoth.-Ztg. 1927, 42, 754) empfiehlt die Verwendung des Natriumsalzes anstatt der freien Säure.

<sup>4</sup> A. KOSSEL u. F. WEISZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1910, 68, 166.

<sup>5</sup> E. RIEGLER: Zeitschr. analyt. Chem. 1914, 53, 242.

analytischer Hinsicht wichtige Angaben gemacht und einige weiteren Reaktionen hinzugefügt.

a) **Biuretreaktion.** D. A. KLING<sup>1</sup> schlägt folgende Art der Ausführung der Reaktion vor: Es werden 9 ccm 10%ige Natronlauge und 1 ccm 1%ige Kupfersulfatlösung gemischt und tropfenweise mit der auf Protein zu prüfenden Lösung versetzt.

PH. A. KOBER und A. B. HAW<sup>2</sup> sowie L. SCHULHOF<sup>3</sup> haben das Spektrum der mit verschiedenen Proteinen eintretenden Reaktionen untersucht; sie fanden, daß der Farbton der Reaktion von der Zahl der Kupferatome (2, 3 oder 4) abhängt, die in den Kupferkomplexverbindungen an die Stickstoffgruppen gebunden sind. — Größere Mengen Glycerin verhindern nach F. B. SEIBERT und E. R. LONG<sup>4</sup> die Biuretreaktion.

b) **Millonsche Reaktion.** F. FLEURY und P. DELAUNEY<sup>5</sup> empfehlen folgende Darstellung eines haltbaren Reagens: 1 Tl. einer 30%igen Lösung von Mercurinitrat in Salpetersäure ( $D = 1,39$ ) wird mit 10 Tln. Wasser vermischt und vor Anstellung der Reaktion werden je Kubikzentimeter 2 Tropfen 10%ige Natriumnitritlösung hinzugesetzt.

c) **Adamkiewitzsche Reaktion**<sup>6</sup> nach V. H. MOTTRAM<sup>7</sup>: 1 ccm Proteinlösung wird mit 1 ccm einer konz. Glyoxylsäure („reduzierter“ Oxalsäure) und 2 ccm konz. Schwefelsäure durchgeschüttelt und 1 Tropfen 1%iger Ferrichloridlösung hinzugegeben. Letzterer Zusatz verstärkt die Tiefe und Bläue der Färbung.

d) **Xanthoproteinreaktion.** Nach K. INOUE<sup>8</sup> und T. B. JOHNSON<sup>9</sup> beruht die Reaktion auf der Bildung von 3-Nitro-tyrosin (Krystalle vom Schmelzp. 233—236°). Ferner ist auch das Tryptophan an der Reaktion beteiligt<sup>10</sup>.

e) **Reaktion mit aromatischen Aldehyden.** Von O. NEUBAUER<sup>11</sup> wurde zuerst beobachtet, daß Proteine mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd eine Rotfärbung geben; auf seine Veranlassung wurde die Reaktion von E. ROHDE<sup>12</sup> näher untersucht, der fand, daß die Reaktion nicht mit aliphatischen, sondern nur mit aromatischen Aldehyden und zwar in verschiedenen Farben eintritt. Besonders geeignet sind die Reaktionen außer mit obigem Aldehyd noch mit Vanillin<sup>13</sup> (Rotviolett färbung) und mit p-Nitro-benzaldehyd (Grünfärbung). Die Reaktion, beruhend auf dem Tryptophangehalt der Proteine, wird, wie folgt, ausgeführt: Man versetzt die auf Proteine zu prüfende Lösung oder Wasseraufschwemmung mit 5—10 Tropfen einer 5%igen Lösung von p-Dimethyl-amino-benzaldehyd in 10%iger Schwefelsäure und setzt dann unter häufigem Umschütteln konz. Schwefelsäure hinzu. Bei Gegenwart von Protein tritt eine rotviolette, nach kurzer Zeit dunkelviolette Färbung ein, die bei zu starkem Schwefelsäurezusatz in ein schmutziges Grün übergeht, dann aber durch Zusatz von etwas Wasser wieder erscheint. Die Reaktion ist am empfindlichsten — es sind 0,015% Casein nachweisbar —, wenn man sie als Ringreaktion ausführt, indem man die zu prüfende Lösung mit einer frisch bereiteten 1%igen Lösung des Aldehyds in konz. Schwefelsäure unterschichtet. Bei Vanillin verwendet man eine alkoholische 5%ige Lösung und p-Nitro-benzaldehyd wendet man in Substanz an.

f) **Liebermannsche Reaktion.** Nach W. A. VAN EKENSTEIN u. J. J. BLANKSMA<sup>14</sup> geben Proteine beim Kochen mit rauchender Salzsäure und Oxymethylfurfur eine dunkelrote, später violette Färbung, wenn sie Tryptophan enthalten. Leim gibt daher die Reaktion nicht. Proteine, welche neben Tryptophan eine Hexosengruppe enthalten, geben die Reaktion ohne Oxymethylfurfur, da sich solches bei der Erhitzung bildet.

<sup>1</sup> D. A. KLING: Journ. Lab. clin. Med. 1929, 15, 185; C. 1930, I, 867.

<sup>2</sup> PH. A. KOBER u. A. B. HAW: Journ. Amer. Chem. Soc. 1916, 38, 457; Z. 1917, 34, 167.

<sup>3</sup> L. SCHULHOF: Magyar. chem. Folyoirat 1931, 37, 10; C. 1931, I, 2645.

<sup>4</sup> F. B. SEIBERT u. E. R. LONG: Journ. Biol. Chem. 1925, 64, 229; Z. 1929, 58, 404.

<sup>5</sup> F. FLEURY u. P. DELAUNEY: Journ. Pharm. et Chim. 1929, (8) 10, 529; C. 1930, I, 1835. — Siehe auch TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensm.-Unters. u. Hygiene 1932, 23, 122.

<sup>6</sup> Vgl. Bd. I, S. 141. — F. G. HOPKINS u. S. W. COLE: Proceed. Roy. Soc., London 1901, 68, 21; C. 1901, I, 797.

<sup>7</sup> V. H. MOTTRAM: Biochem. Journ. 1913, 7, 249; C. 1914, I, 295.

<sup>8</sup> K. INOUE: Zeitschr. physiol. Chem. 1912, 81, 80.

<sup>9</sup> T. B. JOHNSON: Journ. Amer. Chem. Soc. 1915, 37, 2598; C. 1916, I, 469.

<sup>10</sup> E. SALKOWSKI: Zeitschr. physiol. Chem. 12, 215. — E. ABDERHALDEN u. KEMPE: Zeitschr. physiol. Chem. 1907, 52, 207. — FR. LIEBEN: Biochem. Zeitschr. 1924, 145, 534.

<sup>11</sup> O. NEUBAUER: Verh. Gesellsch. Naturf. u. Ärzte Kassel 1903, 68.

<sup>12</sup> E. ROHDE: Zeitschr. physiol. Chem. 1905, 44, 161. — F. A. STEENSMA: Zeitschr. physiol. Chem. 1906, 47, 25.

<sup>13</sup> Vgl. auch L. ROSENTHALER: Apoth.-Ztg. 1907, 22, 678; C. 1907, II, 946.

<sup>14</sup> W. A. VAN EKENSTEIN u. J. J. BLANKSMA: Chem. Weekbl. 1911, 8, 313; Z. 1912, 24, 585.

g) **Arnoldsche Reaktion**<sup>1</sup>. Die Reaktion tritt nur bei solchen Proteinen ein, die eine Sulfhydrylgruppe enthalten oder bei der Denaturierung eine solche bilden. Die Ausführung der Reaktion geschieht nach K. BECK und H. URACK<sup>2</sup>, wie folgt: Zu 2 ccm einer 3%igen Lösung des Proteins in einem Gemisch von Wasser und Harnstoff (1:1) gibt man 3 Tropfen einer 2-äquivalenten Ammoniaklösung und einen etwa 20 mg schweren Nitroprussidnatriumkrystall oder 0,2 ccm einer frisch bereiteten 20%igen Nitroprussidnatriumlösung. Es tritt eine Rosafärbung ein, die nach einiger Zeit in Himbeerrot übergeht.

Bei Proteinen, welche den Schwefel nicht von vornherein in Form einer Sulfhydrylgruppe enthalten, wie Eieralbumin, sondern diese Gruppe erst bei der Denaturierung mit Harnstoff bilden, müssen der Ammoniaklösung 2 Tropfen 10%iger Kaliumcyanidlösung zugesetzt werden; das Nitroprussidnatrium wird dann nach 2 Minuten zugesetzt. Die Empfindlichkeit beträgt infolge des geringen Schwefelgehaltes der Proteine nur 1:100. — Oxydationsmittel verhindern die Reaktion.

h) Über die **Diazoreaktion** von H. PAULY<sup>3</sup>, die **Schwefelbleireaktion** und die **Triketo-hydrinhydratreaktion** (Ninhydrinreaktion) siehe S. 624 und Bd. I, S. 141—142.

i) **Sonstige Reaktionen**. Ferner sind noch Proteinreaktionen mit folgenden Stoffen beschrieben: Diacetyl von A. HARDER u. D. NORRIS<sup>4</sup>, Triformoxim von L. LEWIN<sup>5</sup>, Pikraminsäure von I. OSTROMYSSLENSKI<sup>6</sup>, Dimethylsulfat von S. EDLBACHER<sup>7</sup>, Formaldehyd-Salzsäure und Ferrichlorid von E. SALKOWSKI<sup>8</sup>,  $\alpha$ -Naphthol von S. SAKAGUSCHI<sup>9</sup>.

## B. Bestimmung der Proteine.

### 1. Bestimmung des Rohproteins.

Das Rohprotein bzw. die „Stickstoffsubstanz“ berechnet man unter der Annahme eines mittleren Stickstoffgehaltes des Rohproteins von 16% durch Multiplikation des nach KJELDAHL (S. 575) ermittelten Stickstoffgehaltes mit dem Faktor  $\frac{100}{16} = 6,25$ .

Diese Art der Berechnung ist aber mehr oder weniger ungenau, denn hierbei werden einerseits die in den Lebensmitteln vorkommenden nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen, wie die Aminosäuren, Amide, Alkaloide, Ammoniak, Salpetersäure usw., die einen von 16% stark abweichenden Stickstoffgehalt<sup>10</sup> aufweisen, ganz unberücksichtigt gelassen, und andererseits weichen auch die verschiedenen Proteine selbst in ihrem Stickstoffgehalte zum Teil weit voneinander ab.

Nur bei den tierischen Proteinen beträgt der Stickstoffgehalt annähernd 16%; bei den pflanzlichen Proteinen, besonders bei denen der Samen, ist er nach den Untersuchungen von H. RITTHAUSEN<sup>11</sup>, sowie von WEYL, BARBIERI, E. SCHULZE, MEISSL, OSBORNE, CHITTENDEN u. a. weit höher und schwankt von 16,38—18,73%. H. RITTHAUSEN hat daher vorgeschlagen, für die einzelnen Gruppen der Samen je nach ihrem abweichenden Stickstoffgehalt verschiedene Faktoren für die Proteinberechnung zugrunde zu legen, und zwar für:

<sup>1</sup> V. ARNOLD: Anz. Akad. Wissensch. Krakau A 1910, 56; C. 1910, I, 1888. — Zeitschr. physiol. Chem. 1911, 70, 300; 1913, 83, 304.

<sup>2</sup> K. BECK u. H. URACK: Z. 1933, 65, 399. Die Verfasser haben eine eingehende Prüfung der Reaktion vorgenommen.

<sup>3</sup> H. PAULY: Zeitschr. physiol. Chem. 1904, 42, 508.

<sup>4</sup> A. HARDER u. D. NORRIS: Journ. Physiol. 1911, 42, 332.

<sup>5</sup> L. LEWIN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1913, 46, 1796.

<sup>6</sup> I. OSTROMYSSLENSKI: Journ. Russ. phys.-chem. Ges. (russ.) 1916, 47, 317; C. 1916 I, 682.

<sup>7</sup> S. EDLBACHER: Zeitschr. physiol. Chem. 1919, 105, 240.

<sup>8</sup> E. SALKOWSKI: Zeitschr. physiol. Chem. 1920, 109, 49.

<sup>9</sup> S. SAKAGUSCHI: Journ. Biochemistry 1925, 5, 25; C. 1925, II, 1547. — Vgl. auch K. POLLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, 59, 1927.

<sup>10</sup> Nach G. L. TELLER (Cereal Chem. 1932, 9, 261; C. 1932, II, 461) beträgt der Stickstofffaktor für Asparagin 4,71, Arginin 3,11, Allantoin 2,82, Betain 9,64, Cholin 8,64, Lecithin 57,8.

<sup>11</sup> H. RITTHAUSEN: Landw. Versuchsstationen 1896, 47, 391.

| Gruppe | Art der Samen usw.   | Mittlerer Stickstoffgehalt der Proteine % | Proteinfaktor |
|--------|--|---|---------------|
| I      | Gerstenkörner, Mais, Buchweizen, weiße Bohnen, Sojabohne, Raps und Rüben . . . . .   | 16,66                                     | 6,00          |
| II     | Weizenkörner, Roggenkörner, Haferkörner, Erbsen, Pferdebohnen, Wicken, Candlenuß . . . . .   | 17,60                                     | 5,70          |
| III    | Lein-, Hanf-, Erdnuß- und Baumwollsamensamen, süße und bittere Mandeln, Haselnüsse, Paranüsse, Ricinussamen, Aprikosenkerne, Walnüsse, Sesamsamen, Sonnenblumensamen, Kürbiskerne, Cocosnuß, Lupinen . . . . . | 18,20                                     | 5,50          |

Durch die Nichtberücksichtigung dieser verschiedenen Stickstoffgehalte der Proteine und der nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen sind daher die Bestimmungen des Rohproteins vielfach sehr ungenau; trotzdem bedient man sich in der analytischen Praxis allgemein des Faktors 6,25 zur Berechnung des Rohproteins bzw. der „Stickstoffsubstanz“ aus dem Stickstoffgehalte, da man andernfalls bei jedem Lebensmittel einen besonderen Stickstoff-Faktor verwenden müßte, der nicht nur bei den meisten Lebensmitteln nicht bekannt ist, sondern auch bei jedem Lebensmittel je nach den Wachstumsverhältnissen, der Zubereitungsart usw. mehr oder weniger schwanken wird.

Bei wissenschaftlichen Untersuchungen an verschiedenen Objekten wird man natürlich den richtigen Stickstoff-Faktor anwenden, soweit ein solcher bekannt ist.

Nur in einzelnen Fällen bedient man sich auch in der analytischen Praxis eines anderen, richtigeren Faktors, z. B. bei der Bestimmung des Caseins mit 15,7—15,8% Stickstoff in der Milch des Faktors 6,37, bei der Bestimmung des Leims, der rund 18% Stickstoff enthält, des Faktors 5,55. In allen Fällen muß aber die Anwendung eines von 6,25 abweichenden Faktors in dem Analysenbefund ausdrücklich angegeben werden.

Man muß bei der Anwendung des Faktors 6,25 aber stets berücksichtigen, daß die mit diesem Faktor errechneten mehr oder minder ungenauen Werte für Rohprotein sich auch fehlerhaft auf die Berechnung der sog. „Stickstofffreien Extraktstoffe“ auswirken werden, da diese Stoffe ja meist durch Differenzrechnung ermittelt werden (vgl. dazu S. 835).

## 2. Bestimmung des Reinproteins.

Für die Bestimmung des Reinproteins ist eine große Reihe von Verfahren vorgeschlagen, von denen die folgenden als die brauchbarsten hier beschrieben werden mögen.

a) **Kupferhydroxydverfahren.** Das Kupferhydroxyd wurde zuerst von H. RITTHAUSEN zur Bestimmung der Proteine der Milch vorgeschlagen. A. STUTZER<sup>1</sup> hat diese Fällung zuerst zur Bestimmung des Reinproteins in Futtermitteln angewendet und dabei ein mit glycerinhaltigem Wasser aufgeschlämmtes reines Kupferhydroxyd empfohlen. F. BARNSTEIN<sup>2</sup> hat dann dieses Verfahren vereinfacht, indem er wie H. RITTHAUSEN das Kupferhydroxyd in der zu untersuchenden Flüssigkeit selbst erzeugte. F. BARNSTEIN verfährt, wie folgt: 1—2 g der zu untersuchenden, durch ein 1 mm-Sieb gebrachten Substanz werden in einem Becherglase mit 50 ccm Wasser aufgeköcht bzw. bei stärkehaltigen Stoffen 10 Minuten im Wasserbade erhitzt; sodann setzt man 25 ccm Kupfersulfatlösung (60 g kryst. Kupfersulfat im Liter) und darauf unter Umrühren 25 ccm Natronlauge (12,5 g Natriumhydroxyd im Liter) hinzu. Nach dem Absitzen wird die überstehende Flüssigkeit durch ein Filter abgesehen, der Niederschlag wiederholt mit Wasser dekantiert, schließlich auf das Filter gebracht und mit warmem Wasser so lange ausgewaschen, bis das Filtrat mit Ferrocyankalium- oder Chlorbariumlösung keine Reaktion mehr gibt. Sodann wird der Stickstoffgehalt des Filterinhaltes nach KJELDAHL (S. 575) bestimmt.

<sup>1</sup> A. STUTZER: Journ. Landwirtsch. 1881, 29, 473; Rep. analyt. Chem. 1885, 162. — Vgl. auch B. SJOLLEMA: Z. 1899, 2, 415.

<sup>2</sup> F. BARNSTEIN: Landw. Vers.-Stationen 1900, 54, 327.



Beim Vermischen von 25 ccm Kupfersulfatlösung und 25 ccm Natronlauge der obigen Konzentration entsteht ein grünlicher Niederschlag eines basischen Kupfersulfats mit einem Gehalt von etwa 0,38 g Kupferhydroxyd  $[\text{Cu}(\text{OH})_2]$ , welches letztere offenbar den wirksamen Bestandteil des Niederschlages bildet. Die überstehende Flüssigkeit zeigt noch eine deutliche Reaktion auf Kupfer. Nach diesem Verfahren werden auch dann noch richtige Werte erhalten, wenn Natronlauge in so großer Menge hinzugefügt wird, daß das Kupfer nicht als basisches Salz, sondern vollständig als Oxydhydrat ausgefällt wird; selbstverständlich darf die Menge der Natronlauge aber nicht so groß sein, daß die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit alkalisch reagiert.

A. STUTZER<sup>1</sup> schlägt vor, so viel Natronlauge zuzusetzen, daß  $\frac{2}{3}$  des Kupfers als Hydroxyd und der Rest als basisches Sulfat ausgeschieden werden, während nach der Vorschrift von BARNSTEIN nur  $\frac{1}{4}$  des Kupfers als Hydroxyd und  $\frac{3}{4}$  als basisches Sulfat abgeschieden werden. A. STUTZER empfiehlt daher, statt der obigen Mengen auf 1 g Substanz 100 ccm Wasser, 20 ccm 10%ige Kupfersulfatlösung und 20 ccm 2,5%ige Natronlauge zu verwenden.

C. MANNICH und G. WIPPERLING<sup>2</sup> nehmen an, daß ein Teil des Amidstickstoffs durch den voluminösen Niederschlag adsorptiv gebunden wird. Auch nach F. WEBER<sup>3</sup> werden nach dem Kupferhydroxydverfahren nach STUTZER etwas zu hohe Werte gefunden, dagegen richtige, wenn man die Protein-Kupferhydroxydfällung längere Zeit unter Abschleuderung mit der Zentrifuge auswäscht und mit Schwefelsäure und Natronlauge zweimal umfällt.

Beim Kupferhydroxydverfahren werden Peptone nicht bzw. nicht vollständig<sup>4</sup> mit den übrigen Proteinen gefällt, doch kommen Peptone in natürlichen Pflanzen- und Tierstoffen überhaupt nicht oder doch nicht in nennenswerten Mengen vor<sup>5</sup>. — Nach S. KOSTYTSCHEW<sup>6</sup> sollen sich bei Gegenwart von Aminosäuren und Zuckern (Glucose und Saccharose) schon bei 30—55° Verbindungen zwischen beiden Stoffgruppen bilden, die durch Kupferhydroxyd gefällt werden, worauf vielleicht die Angabe von SCHJERNING<sup>4</sup> beruht, daß „Amin-Amidverbindungen“ mitgefällt werden. Um derartige Bildungen zu beseitigen, könnten vielleicht die Zucker vor der Kupferhydroxydfällung durch Ausziehen mit Alkohol entfernt werden.

b) Uranacetatverfahren von H. SCHJERNING<sup>4</sup>. 0,5—1,0 g Substanz werden in einem geräumigen Becherglase abgewogen, mit 100 ccm Wasser übergossen und hiermit unter wiederholtem Umrühren mehrere Stunden — bis 20 — bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wird die Mischung in ein Wasserbad gebracht und auf 50° erwärmt (Stoffe, welche keine Stärke enthalten, können auch unbedenklich auf 100° erhitzt werden); darauf wird ein Überschuß von Uranacetat<sup>6</sup> — 20—40 ccm einer gesättigten Lösung werden immer hinreichen — zugesetzt. Indem man vor direkter Einwirkung des Lichtes schützt, wird die Mischung unter wiederholtem Umrühren mit einem Glasstabe etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 50° gehalten. Der Niederschlag wird dann auf einem stickstofffreien Filter gesammelt und 2—3mal mit einer kalten 1—2%igen Uranacetatlösung ausgewaschen. Filter und Niederschlag werden in einen  $\frac{1}{4}$  Liter-Kolben gebracht, mit 50 ccm Magnesiamilch — 11 g Magnesiumoxyd auf 2 Liter Wasser — versetzt, gekocht und auf einer Asbestplatte über einer schwachen Gasflamme beinahe, aber doch nicht völlig, zur Trockne eingedampft. In dem Eindampfrückstand wird der Stickstoffgehalt nach KJELDAHL bestimmt. Als Korrektur für die Löslichkeit der Uranfällung ist für je 100 ccm Filtrat und Waschflüssigkeit 0,1 ccm  $\frac{1}{10}$  N.-Säure zu addieren.

Nach H. SCHJERNING können zur Fällung der Reinproteine an Stelle von Kupferhydroxyd ebensogut Zinnchlorür, Bleiacetat, Ferriacetat und Uranacetat abgewendet

<sup>1</sup> A. STUTZER: Journ. Landwirtsch. 1906, 54, 235.

<sup>2</sup> C. MANNICH u. G. WIPPERLING: Z. 1920, 40, 12.

<sup>3</sup> F. WEBER: Zeitschr. Biol. 1926, 84, 169.

<sup>4</sup> H. SCHJERNING: Zeitschr. analyt. Chem. 1900, 39, 545, 633.

<sup>5</sup> Durch die Gegenwart von Peptonen dürften sich auch wohl die zu niedrigen Ergebnisse erklären, welche F. WESTHAUSSER (Zeitschr. physiol. Chem. 1911, 72, 363) und S. KOSTYTSCHEW (Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 130, 34) bei der Bestimmung des Reinproteins durch Kupferhydroxyd bei Pepsinverdauungsprodukten und Hefeautolysaten beobachtet haben.

<sup>6</sup> Statt MERCKs natronfreien Uranacetates (puriss. crystall.), welches häufig basisches Salz enthält, schlägt SCHJERNING vor, das Uranacetat pro analysi zu verwenden, das zwar nicht natronfrei ist, aber dafür kein basisches Salz enthält.

werden; von diesen fällt Zinnchlorür Albumin, Bleiacetat Albumin + Denuclein Ferriacetat Albumin + Denuclein + Proteosen und Uranacetat außer diesen auch noch Peptone.

Neben Ammoniumacetat hat SCHJERNING 20 verschiedene Amide und organische Basen gegen diese Fällungsmittel geprüft und gefunden, daß Zinnchlorür nur Alloxan, Bleiacetat sowie Ferriacetat nur geringe Mengen Alloxan nebst äußerst geringen Mengen Coffein und Chinin, Uranacetat dagegen bloß Piperacin und bei Anwesenheit löslicher Phosphate außerdem auch etwas Asparagin und Arginin sowie ganz geringe Mengen Brucin mit ausfällt. Quecksilberchlorid und Magnesiumsulfat fallen eine größere Menge der Amide oder Basen und sind deshalb für die Fällung des Reinproteins nicht geeignet.

c) **Alkoholverfahren von E. VOIT**<sup>1</sup>. Das Verfahren beruht auf der Fällung der Proteine — außer Gliadin<sup>2</sup> — durch 78 vol.-%igen Alkohol in saurer, mit Natriumsulfat gesättigter Lösung<sup>3</sup>; Polypeptide und Aminosäuren werden dabei nicht gefällt. Nach FR. WEBER<sup>4</sup> verfährt man zweckmäßig, wie folgt: 1—2 g der feinpulverigen Substanz werden mit 45 ccm 0,5%iger Salzsäure oder 1,3%iger Schwefelsäure versetzt, einige Zeit stehen gelassen, mit etwa 190 ccm 95 vol.-%igem Alkohol vermischt und nun 3 Stunden stehen gelassen. Darauf setzt man unter ständigem Schütteln 5 ccm einer 20%igen Lösung von Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) hinzu, füllt mit Alkohol auf 250 ccm auf, läßt wiederum 3 Stunden stehen, filtriert durch ein trockenes Filter und bestimmt in einem aliquoten Teil des Filtrates den „Reststickstoff“ nach KJELDAHL. Gesamt-Stickstoff abzüglich Rest-Stickstoff ergibt den Reinprotein-Stickstoff, der durch Multiplikation mit 6,25 auf Reinprotein berechnet wird.

Liegt eine wäßrige Lösung zur Untersuchung vor, so kann man entweder Salzsäure bis zur Säurereaktion mit Tropaeolin 00 zusetzen und dann auf 45 ccm auffüllen oder soviel von einer dem Volumen der zu untersuchenden Lösung entsprechend berechneten stärkeren Salz- oder Schwefelsäure zusetzen, daß 45 ccm Lösung der obigen 0,53%igen Salz- bzw. 1,3%igen Schwefelsäure entsprechen.

Das Verfahren von E. VOIT liefert nach FR. WEBER gegenüber dem Kupferhydroxydverfahren um 5—6% niedrigere Reinproteinwerte, aber damit übereinstimmende Werte, wenn durch Reinigung des Kupferhydroxydniederschlags (S. 608), die von diesem zurückgehaltenen Nichtproteine entfernt werden.

d) **Ultrafiltration nach C. MANNICH und G. WIPPERLING**<sup>5</sup>. Da alle Proteine Kolloidcharakter besitzen, die nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen der Lebensmittel dagegen Krystalloide sind und daher echte Lösungen bilden, lassen sich die Proteine von den Nichtproteinen durch Ultrafiltration (S. 29) trennen. Man verwendet „Membranfilter“<sup>6</sup> nach R. ZSIGMONDY und W. BACHMANN (S. 34) mit 4 mg Nitrocellulose je Quadratcentimeter und als Filtrationsapparat<sup>6</sup> den von ZSIGMONDY (S. 37).

Ausführung der Bestimmung. 3 g Substanz übergießt man in einem Becherglase mit 100 ccm Wasser, stellt das Gewicht fest und kocht auf bzw. erwärmt bei stärkereichen Substanzen 10 Minuten im Wasserbade auf 60°. Nach dem Erkalten ergänzt man das verdampfte Wasser und filtriert. Sodann unterwirft man das Filtrat der Ultrafiltration bei 15—20 mm Vakuum. Die ersten 15—20 ccm Ultrafiltrat verwirft man, weil sie durch das im Ultrafilter

<sup>1</sup> E. VOIT: Zeitschr. Biol. 1926, 84, 153.

<sup>2</sup> Das Gliadin wird nicht oder nicht vollständig ausgefällt, weil es in saurem Alkohol löslich ist.

<sup>3</sup> Wendet man sauren 78 vol.-%igen Alkohol ohne Salzzusatz an, so werden die nativen Proteine außer dem Casein gefällt, während die entsprechenden denaturierten Proteine und ihre Spaltungsprodukte sowie der Leim in Lösung gehen.

<sup>4</sup> FR. WEBER: Zeitschr. Biol. 1926, 84, 169.

<sup>5</sup> C. MANNICH u. G. WIPPERLING: Z. 1920, 40, 12. — Vgl. auch. W. WINDISCH, W. DIETRICH u. A. MEHLITZ: Wochenschr. Brauerei 1923, 40, 1; Z. 1924, 48, 315.

<sup>6</sup> Zu beziehen von der Membranfilter G. m. b. H. in Göttingen, Fabrikweg 2.

vorhandene Wasser verdünnt sind und weil ihnen stickstoffhaltige Verbindungen durch Adsorption seitens des Ultrafilters entzogen sein können. Von dem weiteren Filtrat verwendet man 50 ccm = 1,5 g angewandte Substanz zur Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL und erhält auf diese Weise den Nichtprotein-Stickstoff und durch dessen Abzug vom Gesamt-Stickstoff den Reinprotein-Stickstoff.

Die Ultrafiltrate von 7 nach diesem Verfahren von C. MANNICH und G. WIPPERLING selbst untersuchten Futtermitteln zeigten keine Proteinreaktionen mit Salpetersäure, Ferrocyanium, Tannin und beim Sättigen mit Ammoniumsulfat. Die Ergebnisse waren bei Pferdebohnen um 0,46%, bei Kartoffeln um 0,29% und bei Lupinen, Bohnenmehl, Baumwollsamemehl, Weizenschrot und Mohrrüben um 0,06–0,15% niedriger als bei dem Verfahren von F. BARNSTEIN mit Kupferhydroxyd.

e) Sonstige Verfahren<sup>1</sup>. Von den sonstigen zur Bestimmung des Reinproteins vorgeschlagenen Fällungsmittel seien noch folgende genannt:

α) Tannin<sup>2</sup>. Durch Tannin sollen auch die Peptone mitgefällt werden (S. 613).

β) Phosphorwolframsäure<sup>3</sup>. J. W. MALLETT<sup>4</sup> teilt die Stickstoffverbindungen nach ihrem Verhalten zu Phosphorwolframsäure (S. 613, Anmerkung 1) in folgende drei Gruppen ein:

1. Es werden selbst aus konzentrierten Lösungen nicht gefällt: Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Tyrosin und Allantoin.

2. Es werden aus konzentrierten Lösungen in der Kälte gefällt (der Niederschlag löst sich mehr oder weniger leicht beim Erwärmen und entsteht wieder beim Erkalten): Glutamin, Kreatin (bei 89,1° löslich 1:107), Kreatinin (bei 97,9° löslich 1:1222), Betain (bei 98,2° löslich 1:71), Hypoxanthin (bei 97,6° löslich 1:98), Carnin (bei 98,4° löslich 1:132), Harnstoff und Peptone.

3. Es werden gefällt, die Niederschläge sind in heißem Wasser kaum oder gar nicht löslich: Eieralbumin, Fibrin, Casein, Legumin, Globulin, Vitellin, Myosin, Syntonin, Hämoglobin, Proteosen, Gelatine und Chondrin.

γ) Bleiacetat<sup>5</sup>, Zinnchlorür<sup>6</sup>, Ferriacetat<sup>7</sup>.

### 3. Bestimmung des verdaulichen Proteins.

Die Bestimmung des verdaulichen Proteins eines Lebensmittels kann außer durch den zeitraubenden und umständlichen natürlichen Verdauungsversuch am Menschen<sup>8</sup> auch künstlich im Laboratorium durchgeführt werden. A. STUTZER<sup>9</sup> hat ein Verfahren hierfür mit einem aus Schweinemägen dargestellten künstlichen Magensaft ausgearbeitet, welcher von G. KÜHN<sup>10</sup> und seinen Mitarbeitern verbessert worden ist und früher allgemeine Anwendung fand. Da die Darstellung des künstlichen Magensaftes aber recht umständlich und der so dargestellte

<sup>1</sup> Eine vergleichende Untersuchung der verschiedenen Fällungsmittel bei Bierwürze bringt H. SCHJERNING in Zeitschr. analyt. Chem. 1894, **33**, 263; 1895, **34**, 135; 1896, **35**, 285; 1897, **36**, 643; 1898, **37**, 73; 1900, **39**, 545.

<sup>2</sup> H. SCHJERNING: Zeitschr. analyt. Chem. 1900, **39**, 545. — W. D. BIGELOW u. F. C. COOK: Journ. Amer. Chem. Soc. 1906, **28**, 1485; Z. 1907, **14**, 223.

<sup>3</sup> SCHMIDT-MÜHLHEIM: Zeitschr. analyt. Chem. 1880, **19**, 127. — KÜHNE u. CHITTENDEN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1887, **20**, 71 (Ref.). — J. SEBELIEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1889, **28**, 383.

<sup>4</sup> J. W. MALLETT: Chem. News 1899, **80**, 117, 168, 179; Z. 1900, **3**, 542.

<sup>5</sup> SESTINI: Landw. Vers.-Stationen **23**, 305. — O. KELLNER: Landw. Vers.-Stationen **24**, 439; **27**, 101. — F. HOFMEISTER: Zeitschr. physiol. Chem. 1878, **2**, 288.

<sup>6</sup> DRECHSEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1890, **23**, 3096. — SIEGFRIED: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1891, **24**, 418.

<sup>7</sup> SCHMIDT-MÜHLHEIM: Zeitschr. analyt. Chem. 1880, **19**, 127.

<sup>8</sup> Vgl. den Abschnitt „Verdaulichkeit der Lebensmittel“, S. 1457.

<sup>9</sup> A. STUTZER: Journ. Landwirtsch. 1880, **28**, 201; 1881, **29**, 475; Zeitschr. physiol. Chem. 1885, **9**, 211; 1887, **11**, 207, 537; Landw. Vers.-Stationen 1889, **36**, 321; 1890, **37**, 107. — Vgl. ferner die Veröffentlichungen in Journ. Landwirtsch. 1906, **54**, 234.

<sup>10</sup> O. KELLNER: Arbeiten der Versuchsstation Möckern 1894, S. 188, oder auch Landw. Vers.-Stationen 1894, **44**, 188.

Magensaft trotz Zusatzes von Chloroform oder Salicylsäure nur beschränkt haltbar ist, haben B. SJOLLEMA<sup>1</sup> und K. WEDEMEYER<sup>2</sup> statt dessen die Anwendung des käuflichen trockenen Pepsins<sup>3</sup> empfohlen. K. WEDEMEYER gibt für die Ausführung der Bestimmung folgende Vorschrift<sup>4</sup>:

2 g Substanz werden in einem Becherglase mit 500 ccm einer klaren Lösung übergossen, welche 1 g Pepsin und 10 ccm 25%ige Salzsäure enthält. Das Becherglas wird mit einer Glasplatte bedeckt und der Inhalt bei 37—40° 48 Stunden lang unter häufigem Umrühren digeriert. Nach 24stündiger Einwirkung werden nochmals 10 ccm 25%ige Salzsäure zugesetzt. Nach Beendigung der Verdauung filtriert man die ungelöste Substanz mit Hilfe einer Saugvorrichtung mit WITTScher Platte und Asbestfilter ab, wäscht mit warmem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion aus, bringt das Asbestfilter mit Inhalt verlustlos in einen Kolben und bestimmt in dem Unlöslichgebliebenen den Stickstoff. Die so gefundene Stickstoffmenge, vom Gesamt-Stickstoff abgezogen, ergibt die Menge des verdaulichen Stickstoffs und dieser, multipliziert mit 6,25, die Menge der verdaulichen Stickstoffsubstanz bzw. des verdaulichen Rohproteins. Die Menge des verdaulichen Reinproteins erhält man durch Abzug der unlöslich gebliebenen (unverdaulichen) Stickstoffsubstanz von dem nach 2 (S. 607) ermittelten Reinprotein.

In Fällen, wo die Menge der unlöslich gebliebenen Substanz sehr groß ist und diese (z. B. bei stärkereichen Lebensmitteln) eine schleimige Beschaffenheit hat, kann man, statt das Unlösliche abzufiltrieren und auszuwaschen, auch die gesamte Verdauungsflüssigkeit einschließlich des ungelöst Gebliebenen auf 1 Liter auffüllen, durch ein großes trockenes Faltenfilter filtrieren und in einem aliquoten Teile des Filtrates den Stickstoff bestimmen. Man erhält dadurch unmittelbar die Menge des verdaulichen Rohproteins und durch deren Abzug vom Gesamtprotein die Menge des unverdaulichen Proteins (Reinproteins). Die Menge des verdaulichen Reinproteins ergibt sich dann durch Abzug des unverdaulichen Reinproteins von dem nach 2 (S. 607) bestimmten Gesamt-Reinprotein.

Das Verfahren von A. STUTZER und auch das obige mit Pepsin sind in erster Linie für die Bestimmung der verdaulichen Stickstoffsubstanz in Futtermitteln ausgearbeitet; sie können aber sinngemäß auch unbedenklich für Lebensmitteluntersuchungen verwendet werden. Man findet nach den eingehenden Untersuchungen von G. KÜHN über die Verdauung mit künstlichem Magensaft — die Verdauung mit Pepsin liefert dieselben Ergebnisse — die sämtlichen verdauungsfähigen Stickstoffsubstanzen der Futtermittel und für die Stickstoffsubstanzen der Lebensmittel dürfte das gleiche zutreffen. Eine Nachbehandlung des im Magensaft unlöslichen Rückstandes mit alkalischem Pankreassaft, wie sie A. STUTZER empfohlen hat, dürfte daher nicht erforderlich sein. Vgl. dazu S. 1465.

#### 4. Bestimmung von Proteosen und Peptonen.

Über den Begriff Proteosen und Peptone sowie ihre wesentlichen Eigenschaften siehe Bd. I, S. 147; bemerkt sei davon hier nur, daß zum Nachweise der Proteosen und Peptone in Lösungen, welche keine anderen Proteine und keine einfacheren Verbindungen wie Biuret, Oxamid und Malonamid — die in der Natur nicht vorkommen — enthalten, die Biuretreaktion dient, und zwar tritt sie mit roter bis violetter Farbe auf.

<sup>1</sup> B. SJOLLEMA: Z. 1899, 2, 413.

<sup>2</sup> K. WEDEMEYER: Landw. Vers.-Stationen 1899, 51, 383.

<sup>3</sup> Für die Prüfung des Pepsins auf seine Wirksamkeit gibt das Deutsche Arzneibuch VI folgende Vorschrift: „Von einem Hühnerei, das 10 Minuten in kochendem Wasser gelegen hat, wird nach dem sofortigen Abkühlen in kaltem Wasser das Eiweiß durch ein zur Bereitung von grobem Pulver bestimmtes Sieb gerieben. 10 g dieses zerteilten Eiweißes werden mit 100 ccm Wasser von 50° und 0,5 ccm Salzsäure gleichmäßig zerteilt; der Mischung wird 0,1 g Pepsin hinzugefügt. Läßt man dieses Gemisch, alle Viertelstunden umschwenkend, 3 Stunden lang bei 45° stehen, so muß das Eiweiß bis auf wenige weißgelbliche Häutchen gelöst sein.“ 0,2 g Pepsin dürfen nach dem Verbrennen höchstens 0,002 g Rückstand hinterlassen.

<sup>4</sup> Die Vorschrift von SJOLLEMA ist nicht wesentlich von der von WEDEMEYER verschieden; sie sieht einen viermaligen Zusatz von 10%iger Salzsäure vor.

Zur Bestimmung der Proteosen und Peptone zieht man die zu untersuchende Substanz, und zwar je nach dem Gehalt an diesen Verbindungen 5 oder 10 g, mit kaltem Wasser aus, indem man die Substanz in einem 250 ccm-Kolben einige Zeit mit 200 ccm Wasser schüttelt. Darauf füllt man bis zur Marke auf und filtriert die Flüssigkeit durch ein trockenes Filter. Das Filtrat prüft man zunächst auf Albumin, indem man einige Kubikzentimeter in einem Reagensglase mit etwas Salpetersäure kocht. Ist Albumin in der Lösung vorhanden, so scheidet es sich in Flocken aus. In diesem Falle muß man aus 50 oder 100 ccm der Lösung in der angegebenen Weise das Albumin zunächst vollkommen abscheiden, es abfiltrieren und auswaschen.

a) **Bestimmung der Proteosen nach A. BÖMER<sup>1</sup>** durch Sättigen ihrer Lösung mit Zinksulfat<sup>2</sup>. Die von unlöslichen Proteinen und Albumin in der vorstehend angegebenen Weise befreite wäßrige Lösung oder, wenn kein Albumin vorhanden ist, 50—100 ccm der ursprünglichen Lösung werden in einem kleinen Becherglase auf 40—50 ccm eingengt, mit Schwefelsäure schwach angesäuert (um das Ausfallen von unlöslichen Zinkverbindungen, wie Phosphaten usw. zu verhindern) und darauf die Lösung mit feingepulvertem Zinksulfat in der Kälte gesättigt. Nachdem sich die ausgeschiedenen Proteosen (an der Oberfläche der Flüssigkeit) abgesetzt haben und am Boden des Glases noch geringe Mengen ungelösten Zinksulfates vorhanden sind, werden die Proteosen abfiltriert, mit kaltgesättigter Zinksulfatlösung hinreichend ausgewaschen<sup>3</sup> und nach KJELDAHL verbrannt. Durch Multiplikation der gefundenen Stickstoffmenge mit 6,25 erhält man die entsprechenden Mengen Proteosen<sup>4</sup>.

Sind größere Mengen Ammoniak in der Substanz, so können diese unter Bildung eines schwer löslichen Doppelsalzes von Ammonium- und Zinksulfat mit in die Proteosenfällung übergehen; in diesem Falle wird entweder der Filterinhalt in dem KJELDAHL-Kolben zunächst mit Magnesiamilch längere Zeit erwärmt und dann zur Bestimmung des Proteosenstickstoffs verwendet, oder es werden weitere 50 ccm der Proteosenlösung in der obigen Weise mit Zinksulfat gesättigt und in dem hierbei erhaltenen, abfiltrierten Niederschlage wird durch Destillation mit Magnesia sein Gehalt an Ammoniakstickstoff bestimmt und von dem Gesamt-Stickstoffgehalt des Zinksulfatniederschlages in Abzug gebracht.

b) **Bestimmung der Peptone.** Im Filtrat von der Zinksulfatfällung finden sich die etwa vorhandenen Peptone. Man füllt das Filtrat mit Wasser auf 250 ccm auf und prüft zunächst 20—25 ccm der Lösung qualitativ auf Peptone. Zu dem Zwecke versetzt man die 20—25 ccm Lösung mit so viel konz. Natronlauge, bis das anfänglich sich ausscheidende Zinkhydroxyd sich wieder vollständig gelöst hat und fügt einige Tropfen 1%ige Kupfersulfatlösung hinzu. Eine carminrote bis violettrote Färbung zeigt das Vorhandensein von Peptonen<sup>5</sup> an.

Sind Peptone vorhanden, so werden 100 ccm des auf 250 ccm aufgefüllten Filtrates der Zinksulfatfällung zur Bestimmung der Peptone mit einer stark

<sup>1</sup> A. BÖMER: Zeitschr. analyt. Chem. 1895, 34, 562. — K. BAUMANN u. A. BÖMER: Z. 1898, 1, 106.

<sup>2</sup> Von KÜHNE wurde die Fällung der Proteosen durch Sättigen ihrer Lösung mit Ammoniumsulfat vorgeschlagen. Dieses Verfahren bietet aber wegen des Stickstoffgehaltes des Fällungsmittels erhebliche Schwierigkeiten. Das Verfahren dürfte daher heute wohl kaum mehr angewendet werden.

<sup>3</sup> Wenn man dafür sorgt, daß beim Filtrieren und Auswaschen der Inhalt des Filters nicht längere Zeit unbedeckt steht — wodurch eine vollständige Erhärtung der Masse durch nachträgliches Auskrystallisieren von Zinksulfat eintritt, — so geht das Filtrieren der Lösung und das Auswaschen mit der gesättigten Zinksulfatlösung sehr schnell.

<sup>4</sup> Bei Anwendung eines quantitativen Filters dürfte dessen Stickstoffgehalt unberücksichtigt bleiben können; im anderen Falle ist sein Stickstoffgehalt in Abzug zu bringen.

<sup>5</sup> In natürlichen Substanzen des Tier- und Pflanzenreiches kommen Peptone überhaupt nicht oder nur in nicht nennenswerter Menge vor.

angesäuerten Lösung von Phosphorwolframsaurem Natrium<sup>1</sup> so lange versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht; der Niederschlag wird nach etwa 12stündigem Stehen bei Zimmertemperatur durch ein Filter von bekanntem Stickstoffgehalt<sup>2</sup> filtriert, mit verd. Schwefelsäure (1 + 3) ausgewaschen, samt Filter noch feucht in einen Kolben gegeben und der Stickstoffgehalt nach KJELDAHL ermittelt. Durch Multiplikation des gefundenen Stickstoffgehaltes mit 6,25 erhält man die Menge der vorhandenen Peptone.

Man kann auch das albuminfreie Filtrat nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure direkt mit Phosphorwolframsaurem Natrium fällen; man erhält auf diese Weise Proteosen- + Peptonstickstoff und nach Abzug des durch Zinksulfat gefällten Proteosenstickstoffes den Peptonstickstoff; jedoch ist die vorherige Ausfällung der Proteosen vorzuziehen.

Bei der Peptonfällung durch Phosphorwolframsäure ist zu berücksichtigen, daß durch dieses Reagens außer Peptonen auch zahlreiche andere organische Stickstoffverbindungen und Ammoniak (vgl. S. 610) gefällt werden. Letzteres läßt sich in einer zweiten Fällung durch Destillation des Niederschlages mit gebrannter Magnesia bestimmen und von dem Gesamt-Stickstoff des Niederschlages in Abzug bringen. Für die organischen Basen ist aber eine gesonderte Bestimmung neben den Peptonen bis jetzt nicht möglich. Man prüft hierauf qualitativ, indem man das Filtrat von dem Zinksulfatniederschlage mit überschüssigem Ammoniak bis zur deutlichen alkalischen Reaktion versetzt, von einem etwa entstehenden Niederschlage (Phosphate) abfiltriert und zu dem Filtrat eine Lösung von Silbernitrat (etwa 2,5 g in 100 ccm Wasser) hinzufügt. Ein entstehender Niederschlag zeigt organische Basen (Xanthinbasen, vgl. oben S. 610) an. Bleibt ein solcher Niederschlag aus, so darf man noch nicht auf Abwesenheit von organischen Basen überhaupt schließen; weil aber die Xanthinbasen am weitesten im Pflanzen- und Tierreich verbreitet sind, so deutet das Ausbleiben eines Niederschlages mit Silbernitrat darauf hin, daß die Menge an organischen Basen nur gering ist. Man kann alsdann, wenn gleichzeitig eine deutliche qualitative Reaktion auf Peptone eingetreten ist, den durch Phosphorwolframsaures Natrium gefällten Stickstoff als vorwiegend Peptonstickstoff annehmen. Könnten dagegen qualitativ keine Peptone nachgewiesen werden, so stammt der durch Phosphorwolframsaures Natrium gefällte Stickstoff — nach Abzug des Ammoniakstickstoffs — vorwiegend aus stickstoffhaltigen organischen Basen. Richtiger aber bringt man die durch Zinksulfat gefällten Stickstoffverbindungen als „Proteosenstickstoff“, die durch Phosphorwolframsaures Natrium gefällten Stickstoffverbindungen als „Pepton- + Basenstickstoff“ zum Ausdruck.

c) W. D. BIGELOW und F. C. COOK<sup>3</sup> bestimmen (in Fleischpräparaten) die Proteosen und Peptone zusammen durch Fällung mit Tannin in der mit Natriumchlorid versetzten Lösung und bringen davon die mit Zinksulfat bestimmten Proteosen in Abzug. Bezüglich der Einzelheiten der Bestimmung sei auf die Originalmitteilung verwiesen.

### C. Hydrolyse der Proteine.

Um einen näheren Einblick in die Zusammensetzung der Proteine zu gewinnen, insbesondere ihre Bausteine, die Aminosäuren, der Art und Menge nach kennen zu lernen, bedient man sich der Proteinhydrolyse mit Salz- oder Schwefelsäure und bestimmt die dabei entstehenden Aminosäuren. Diese Bestimmung erfolgt nach dem Verfahren von E. FISCHER für die Monoaminosäuren, nach dem Verfahren von A. KOSSEL und E. SCHULZE für die Diaminosäuren, während D. D. VAN SLYKE die Diaminosäuren einzeln und die Monoaminosäuren zusammen bestimmt.

<sup>1</sup> Zur Herstellung der Phosphorwolframsäurelösung werden 120 g Dinatriumphosphat und 200 g Natriumwolframat in 1 Liter Wasser gelöst und zu dieser Lösung 100 ccm verd. Schwefelsäure (1 + 3) gegeben. Soll die Lösung längere Zeit aufbewahrt werden, so empfiehlt es sich, die Schwefelsäure erst vor dem Gebrauch der Lösung zuzusetzen.

<sup>2</sup> Siehe Fußnote 4 S. 612.

<sup>3</sup> W. D. BIGELOW u. F. C. COOK: Journ. Amer. Chem. Soc. 1906, 28, 1485; Z. 1907, 14, 223.

Da die Ausführung der Bestimmung der meisten Aminosäuren sehr langwierig und umständlich ist und die Ergebnisse vielfach nur annähernde sind, soll hier von einer eingehenden Beschreibung der Verfahren abgesehen und nur ihr Wesen kurz beschrieben werden.

a) **Verfahren von E. Fischer**<sup>1</sup>. Die Hydrolyse erfolgt entweder mit Schwefelsäure oder besser mit Salzsäure; mit letzterer geschieht sie, wie folgt:

Man übergießt das Protein in einem Kolben mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure (1,19) läßt unter häufigem Umschwenken einige Zeit stehen und kocht alsdann 5—6 Stunden am Rückflußkühler, wobei die Lösung unter Abscheidung von Huminstoffen und fettsäureähnlichen Massen eine dunkelviolette bis tiefdunkle Färbung annimmt. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck in einem Kolben eingedampft, der Rückstand mit absol. Alkohol aufgenommen und zur Veresterung der Aminosäuren in die Lösung trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Aus dem Reaktionsprodukt werden die Ester unter Zusatz von Alkali mit Äther ausgezogen oder mit Natriumäthylat verseift und dann unter vermindertem Druck (bis 0,5 mm) der fraktionierten Destillation unterworfen, wobei 5—6 Fraktionen (bis 160°) gezogen werden. Die Fraktionen der Ester werden dann durch Wasser, Salzsäure oder Bariumhydroxyd verseift und darauf die Monoaminosäuren nach je nach dem Einzelfall verschiedenen Verfahren isoliert und bestimmt.

Nach E. ABDERHALDEN u. WEIL<sup>2</sup> treten bei diesem Verfahren beträchtliche Verluste ein, z. B. bei Asparagin etwa 40% und bei Glutaminsäure etwa 30%.

b) **Verfahren von A. Kossel**<sup>3</sup> und E. Schulze<sup>4</sup>. Die Bestimmung der Diaminosäuren, vorwiegend Arginin, Histidin und Lysin, nach diesem Verfahren setzt voraus, daß sie möglichst frei von Monoaminosäuren sind und sich in schwefelsaurer Lösung befinden. Der Untersuchungsgang ist dann folgender:

Die zu untersuchenden Proteine werden mit der neunfachen Menge 1 : 2 verd. Schwefelsäure 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Aus der Lösung wird der „Huminstickstoff“ durch Barytlösung abgeschieden. Liegen in der Lösung nur geringe Mengen Diaminosäuren neben größeren Mengen Monoaminosäuren vor, wie dies bei der Mehrzahl der Proteine der Fall ist, so werden erstere in verdünnter schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure abgeschieden und damit vom größten Teil der letzteren getrennt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird mit Barytwasser zerlegt, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert, mit Silbersulfat erwärmt, auf 40° abgekühlt und mit Bariumhydroxyd gesättigt. Der entstehende Niederschlag enthält das Histidin und Arginin, die Lösung das Lysin. Das Histidin wird aus dem entsilberten Niederschlag wiederum als Histidinsilber abgeschieden und im Filtrat davon der Argininstickstoff nach KJELDAHL bestimmt. Das Lysin wird aus seiner Lösung mit Phosphorwolframsäure abgeschieden, wobei die Monoaminosäuren in Lösung bleiben.

c) **Verfahren von D. D. van Slyke**<sup>5</sup>. Die Proteine werden durch 16—18stündiges Kochen mit 20%iger Salzsäure hydrolysiert und die Lösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. In einem Teil der Lösung wird das Ammoniak durch Destillation mit Kalkmilch bestimmt und in dem unlöslichen Rückstande der Destillation der Stickstoff des Melanins, d. h. der bei Hydrolyse entstandenen unlöslichen schwarz gefärbten Stickstoffverbindungen, bestimmt. In der mit Salzsäure angesäuerten Lösung des Destillationsrückstandes werden die Hexonbasen (Arginin, Histidin, Lysin) und Cystin mit Phosphorwolframsäure in salzsaurer Lösung gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird in Natronlauge gelöst und die Phosphorwolframsäure mit Bariumchlorid ausgeschieden. In einem Teile der eingeengten Lösung bestimmt man die Aminosäuren nach dem Nitritverfahren (S. 619), und in einem anderen Teile das Ammoniak, das sich beim Erhitzen der Hexonbasen mit starker Kalilauge bildet und mit titrierter Schwefelsäure aufgefangen wird. Den Cystingehalt ermittelt man durch Bestimmung des organisch gebundenen Schwefels. Der Lysingehalt wird durch Differenzrechnung gefunden. — Im Filtrat der Fällung mit Phosphorwolframsäure wird der Gesamt-Stickstoff nach KJELDAHL und ferner der Monoaminosäuren-Stickstoff nach dem Nitritverfahren (S. 619) bestimmt.

R. A. GORTNER und W. M. SANDSTROM<sup>6</sup> haben das VAN SLYKESCHE Verfahren einer Nachprüfung unterzogen und gefunden, daß durch 24stündiges Kochen von Aminosäurelösung bei Gegenwart von Salzsäure beträchtliche Verluste an einzelnen Aminosäuren eintreten.

<sup>1</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, **39**, 530. — E. FISCHER: Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine, S. 55. Berlin: Julius Springer 1906.

<sup>2</sup> E. ABDERHALDEN u. WEIL: Zeitschr. physiol. Chem. 1912, **74**, 445.

<sup>3</sup> A. KOSSEL u. PATTEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1901, **31**, 165; 1903, **38**, 39.

<sup>4</sup> E. SCHULZE u. E. WINTERSTEIN: Zeitschr. physiol. Chem. 1901, **33**, 547.

<sup>5</sup> D. D. VAN SLYKE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, **43**, 3170; 1911, **44**, 1684.

<sup>6</sup> R. A. GORTNER u. W. M. SANDSTROM: Journ. Amer. Chem. Soc. 1925, **47**, 1663; Z. 1927, **53**, 280.

## II. Aminosäuren.

Aminosäuren (Aminofettsäuren), als Bausteine der Proteine, treten frei häufig da auf, wo Proteine auf- oder abgebaut werden; sie finden sich daher auch, allerdings nur in geringer Menge, in Lebensmitteln. Infolgedessen ist ihr Nachweis und ihre Bestimmung häufiger erforderlich.

Über Vorkommen, Eigenschaften, chemisches Verhalten usw. der Aminosäuren siehe Bd. I, S. 117—138.

### A. Allgemeine Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung von Aminosäuren.

#### 1. Nachweis von Aminosäuren.

Zum Nachweis von Aminosäuren neben anderen Verbindungen können vielfach außer den auch zu ihrer Bestimmung dienenden Methoden (S. 617) noch folgende Verfahren<sup>1</sup> Verwendung finden:

a) **Kupferverbindungen.** Die zu prüfende Lösung wird mit Kupferhydroxyd oder -carbonat erhitzt; bei der Einengung des Filtrates scheiden sich die meist blauen Kupferverbindungen der Aminosäuren krystallinisch ab.

b) **Quecksilberverbindungen.** Nach C. NEUBERG u. J. KERB<sup>2</sup> werden Aminosäuren durch Mercuriacetat und Alkohol in durch Natriumcarbonat schwach alkalischer Lösung gefällt, wahrscheinlich unter Bildung basischer Salze der entsprechenden Carbaminsäuren, z. B. bei Glykokoll unter Bildung von  $\begin{matrix} \text{CH}_2 \cdot \text{COO} \\ \text{NH} \cdot \text{COO} \end{matrix} > \text{Hg} \cdot \text{HgO}$ . Die Aminosäuren können aus dem Niederschlage durch Zersetzung mit Schwefelwasserstoff rein wiedergewonnen werden. Von fast allen Aminosäuren werden 95% gefällt; nur bei Prolin und Valin entziehen sich 25—30% der Ausfällung.

c) **Benzoylchlorid**<sup>3</sup>, **Benzolsulfochlorid**<sup>4</sup>,  **$\alpha$ -Naphthalinsulfochlorid**<sup>5</sup>, **Phenylisocyanat**<sup>6</sup>,  **$\alpha$ -Naphthylisocyanat**<sup>7</sup> geben mit Aminosäuren in alkalischer Lösung Verbindungen, die zum Nachweis der einzelnen Aminosäuren dienen und aus denen die Aminosäuren rein dargestellt werden können.

Die Darstellung der Benzoylverbindungen geschieht nach E. FISCHER<sup>3</sup> in der Weise, daß man die mit Natriumcarbonat versetzte Lösung mit Benzoylchlorid schüttelt, das man unter Kühlung in kleinen Anteilen zugibt. Nach dem Filtrieren säuert man mit Salzsäure an und zieht aus dem ausfallenden Gemisch von Benzoesäure und der Benzoylaminosäure die erstere durch wiederholtes Auskochen mit Ligroin aus. Die Benzoylaminosäure wird durch Kochen mit Säuren oder Alkalien zu Benzoesäure und der Aminosäure aufgespalten.

Die Schmelzpunkte dieser und einiger anderer Verbindungen der Aminosäuren sind in der Tabelle 1 auf S. 616 zusammengestellt.

d) Über die Darstellung der **Alkylester** nach E. FISCHER siehe S. 614.

e) **Farbreaktionen.**  $\alpha$ ) Mit Ninhydrin (S. 624) geben Aminosäuren eine Blaufärbung; Polypeptide und Proteine geben die Reaktion ebenfalls. Die Empfindlichkeitsgrenze der Reaktion liegt bei den verschiedenen Aminosäuren nach E. ABDERHALDEN und H. SCHMIDT<sup>8</sup> zwischen 1 : 15000 bis 1 : 79000.

$\beta$ ) Mit Alloxan geben nach F. LIEBEN und E. EDEL<sup>9</sup> Aminosäurelösungen, ausgenommen Prolin, eine Rosafärbung, die sich bei 10 Minuten langem Erwärmen auf 75° noch verstärkt, aber dann alsbald verblaßt; die Lösung muß vor dem Erwärmen gegen Lackmus

<sup>1</sup> Vgl. L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen, S. 608f. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914. — H. MEYER: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen. Berlin: Julius Springer 1933. — Dasselbst sind auch noch weitere Reaktionen angegeben.

<sup>2</sup> C. NEUBERG u. J. KERB: Biochem. Zeitschr. 1912, **40**, 498.

<sup>3</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, **32**, 2453.

<sup>4</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1900, **33**, 2380.

<sup>5</sup> E. FISCHER u. P. BERGEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, **35**, 3779.

<sup>6</sup> C. PAAL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, **27**, 975. — E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1900, **33**, 2381.

<sup>7</sup> C. NEUBERG u. A. MANASSE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, **38**, 2359.

<sup>8</sup> E. ABDERHALDEN u. H. SCHMIDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1901, **72**, 37.

<sup>9</sup> F. LIEBEN: u. E. EDEL: Biochem. Zeitschr. 1931, **244**, 403.



neutralisiert werden. Die Reaktion ist wenig empfindlich. Cystin gibt eine orangerote Färbung; Proteine geben die Reaktion ebenfalls.

γ) Mit p-Kresol und Tyrosinase geben Aminosäuren nach R. CHODAT<sup>1</sup> eine Rotfärbung, welche mehr oder weniger rasch in eine Blaufärbung mit rotem Dichroismus übergeht.

δ) Mit p-Nitrobenzoylchlorid geben α-Aminosäuren — mit Ausnahme von Prolin und Oxyprolin — nach E. WASER und E. BRAUCHLI<sup>2</sup> eine noch in der Verdünnung 1 : 100000 eintretende Reaktion, für die E. WASER<sup>3</sup> neben zwei anderen folgende Ausführungsform vorschlägt: 0,5—1 ccm der zu prüfenden Lösung wird mit ungefähr der gleichen Menge Pyridin und mit einigen Körnchen p-Nitrobenzoylchlorid versetzt und zum Sieden erhitzt. Dann gibt man unter Umschütteln tropfenweise verd. Natriumcarbonatlösung hinzu, worauf bei Gegenwart von Aminosäuren eine dunkelweinrote bis violettblaue Färbung eintritt. Ist sehr viel Aminosäure vorhanden, so tritt die Reaktion schon in der Kälte ohne Natriumcarbonatzusatz ein.

Tabelle 1. Schmelzpunkte<sup>4</sup> von Aminosäureverbindungen<sup>5</sup>.

| Aminosäuren        | Aminosäure           | Benzoyl-Verbindung   | β-Naphthylsulfo-Verbindung | Phenylisocyanat-Verbindung | α-Naphthylisocyanat-Verbindung | Pikrolonat     | Pikrat         |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------|----------------|
| Glykokoll . . . .  | 232—236<br>(a)       | 187,5                | 159 (w)                    | 195 (w)                    | 191 (w)                        | 214—215        | 199—200        |
| Alanin . . . . .   | 295 (w)              | 165—166<br>(w)       | 152—153 <sup>6</sup>       | 168—170                    | 198 (a)                        | 214            | —              |
| Valin . . . . .    | 315                  | —                    | —                          | 147 (w)                    | —                              | 170—180        | —              |
| Leucin . . . . .   | 293—295              | 105—107              | 68                         | —                          | 163,5                          | 145—150        | —              |
| Isoleucin . . . .  | 280                  | —                    | —                          | 119—120                    | 178                            | 170            | —              |
| Phenylalanin . .   | 283                  | —                    | —                          | 182                        | —                              | 208            | —              |
| Tyrosin . . . . .  | 314—318<br>(w)       | —                    | —                          | —                          | 205—206                        | 260            | —              |
| Serin . . . . .    | 246 (w) <sup>7</sup> | —                    | 214 (a)                    | —                          | —                              | 265            | —              |
| Cystin . . . . .   | 258—261              | 180—181<br>(a)       | 215 (a)                    | 160 (ac)                   | —                              | —              | —              |
| Asparaginsäure .   | 270—271<br>(w)       | 184—185<br>(w)       | —                          | —                          | —                              | —              | —              |
| Glutaminsäure .    | 224—225<br>(w)       | 155—157<br>(w)       | —                          | —                          | —                              | —              | —              |
| Arginin . . . . .  | 238                  | 217—218<br>(w)       | 87—88<br>(a)               | —                          | —                              | 225            | 217—218<br>(w) |
| Lysin . . . . .    | —                    | 145—146<br>(ac)      | —                          | 183—184<br>(a)             | —                              | 246—252<br>(w) | 230 (w)        |
| Ornithin . . . .   | 140 (a)              | 187—188<br>(184—185) | —                          | —                          | —                              | —              | 208 (w)        |
| Histidin . . . . . | 285 (w) <sup>8</sup> | —                    | 149—150<br>(a)             | —                          | —                              | —              | 153—154        |
| Prolin . . . . .   | 203 bis<br>203,5     | —                    | —                          | 170 (ac)                   | —                              | —              | 135—137<br>(a) |
| Oxyprolin . . . .  | 270                  | —                    | 91—92                      | —                          | —                              | —              | —              |
| Tryptophan . . .   | 289                  | 185                  | —                          | 166 (a)                    | —                              | —              | —              |

(a) aus Alkohol, (ac) aus Aceton, (w) aus Wasser kristallisiert.

<sup>1</sup> R. CHODAT: Arch. sienc. phys. et nat. Genève 1912, (4) 33, 70, 225; C. 1912, I, 1032, 2039.

<sup>2</sup> E. WASER u. E. BRAUCHLI: Helv. chim. acta 1924, 7, 757; C. 1924, II, 947.

<sup>3</sup> E. WASER: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1929, 20, 260.

<sup>4</sup> Meist korrigierte Schmelzpunkte.

<sup>5</sup> Nach L. ROSENTHALER: Der Nachweis organischer Verbindungen. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914; und H. MEYER: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen. Berlin: Julius Springer 1933.

<sup>6</sup> Nach einer anderen Angabe 122—123°.

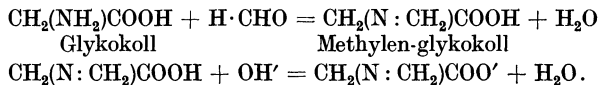
<sup>7</sup> Nach einer anderen Angabe 228°.

<sup>8</sup> Nach einer anderen Angabe 253°.

## 2. Bestimmung von Aminosäuren.

Wenn in der zu untersuchenden Lösung nur eine einzelne Aminosäure vorhanden ist oder die Gesamtmenge des in der Form von Aminosäuren vorhandenen Stickstoffs bestimmt werden soll, so können dazu folgende Verfahren verwendet werden:

a) **Formolverfahren nach S. P. L. SÖRENSEN**<sup>1</sup>. Das Verfahren beruht auf der Beobachtung von H. SCHIFF<sup>2</sup>, daß neutrale wäßrige Aminosäurelösungen bei Zusatz von neutraler Formaldehydlösung<sup>3</sup> unter Bildung von Methylensubstitutionsverbindungen saure Reaktion annehmen und die Menge der Säure und damit der Aminosäuren titrimetrisch bestimmt werden kann. Die Umsetzung erfolgt nach folgenden Formeln:



Beide Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen; sie verlaufen in obigem Sinne nur praktisch vollständig, wenn bei der ersten Reaktion ein ausreichender Überschuß von Formaldehyd und bei der Titration ein Überschuß von Hydroxylyon angewendet wird, d. h. bis  $[\text{H}']$  auf  $10^{-9,1}$  zurückgedrängt ist.

Das Verfahren bestimmt nur die Aminosäuren, nicht wie das Nitritverfahren (S. 619) die Amide jeder Art, z. B. auch die Säureamide.

Bei den Aminosäuren Prolin und Tyrosin liefert das Formolverfahren unsichere Ergebnisse, indem bei Prolin mit Phenolphthalein nur 80% und mit Thymolphthalein nur 92% der berechneten Menge Stickstoff angezeigt werden. Tyrosin verbraucht wegen des sauren Charakters seiner Phenolgruppe bei Phenolphthalein 109% und bei Thymolphthalein 137,5% der berechneten Säuremenge<sup>4</sup>.

Ammoniumsalze reagieren mit Formaldehyd unter Bildung von Hexamethylentetramin ebenfalls; das Ammoniak muß daher vorher entfernt werden. Carbonate und Phosphate, welche störend wirken, müssen durch Zusatz von Bariumchlorid und Bariumhydroxyd entfernt werden.

α) **Verfahren von J. KÖNIG und J. GROSSFELD**<sup>5</sup>. Die Formoltitrierung erfolgt am einfachsten in folgender Weise:

1. Erforderliche Lösungen. 1. 0,2 N.-Baryt- oder Natronlauge (kohlenstofffrei);
2. 0,2 N.-Salzsäure;
3. 0,5 g Phenolphthalein in 100 ccm Alkohol von 50 Vol.-%;
4. 30—40%ige Formaldehydlösung, bis zur schwachen Rosafärbung von Phenolphthalein neutralisiert;
5. Vergleichslösung: 50 ccm ausgekochtes Wasser werden mit 20 ccm der Formaldehydlösung (4) und 5 ccm 0,2 N.-Natronlauge sowie mit 1 oder 2 ccm Phenolphthaleinlösung (3) versetzt und mit 0,2 N.-Salzsäure auf schwaches Rosa titriert; dann werden noch 3 Tropfen Natronlauge (1) zugegeben, so daß starke Rotfärbung eintritt.

Ausführung der Bestimmung. 50 ccm<sup>6</sup> der zu untersuchenden Flüssigkeit werden in einem 100 ccm-Kolben mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung, 10 ccm 20%iger Bariumchloridlösung und darauf mit gesättigter Barytlauge bis zur Rotfärbung versetzt und alsdann wird noch ein Überschuß von etwa 5 ccm Barytlauge hinzugegeben. Nach dem Auffüllen auf 100 ccm filtriert man nach 15 Minuten durch ein trockenes Filter.

<sup>1</sup> S. P. L. SÖRENSEN: Biochem. Zeitschr. 1909, 7, 45. — V. HENRIQUES u. S. P. L. SÖRENSEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1909, 63, 27.

<sup>2</sup> H. SCHIFF: Ann. Chem. 1899, 310, 25; 1901, 319, 59, 287; 1902, 325, 348.

<sup>3</sup> Die Bezeichnung „Formol“ ist von SÖRENSEN ihrer Kürze wegen für Formaldehyd vorgeschlagen.

<sup>4</sup> Vgl. auch A. CLEMENTI: Atti R. Acad. Lincei Roma 1915, 24, I, 352; Z. 1918, 35, 283. — D. W. WILSON: Journ. Biol. Chem. 1923, 56, 191; C. 1923, IV, 565. — S. L. JODIDI: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, 48, 751.

<sup>5</sup> J. KÖNIG u. J. GROSSFELD: Z. 1914, 27, 508.

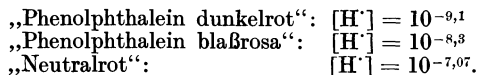
<sup>6</sup> Bei konz. Lösungen entsprechend weniger.

50 ccm des Filtrates werden möglichst genau unter Lackmuspapiertüpfelung neutralisiert, mit 20 ccm Formaldehydlösung (4) versetzt und darauf bis zur Farbstärke der Vergleichslösung (5) mit 0,2 N.-Natronlauge titriert; dann werden noch einige Kubikzentimeter Natronlauge zugegeben und wieder so viel 0,2 N.-Salzsäure, daß die Farbe schwächer rot ist als die Vergleichslösung; dann wird abermals 0,2 N.-Natronlauge zugegeben, bis die Farbe der Vergleichslösung erreicht ist (Kubikzentimeter 0,2 n NaOH — Kubikzentimeter 0,2 n HCl) · 2,8 = Milligramm formoltitrierbarer Stickstoff.

Etwaiges in der zu untersuchenden Flüssigkeit vorhandenes Ammoniak muß vorher, am besten nach dem Verfahren von FOLIN (S. 646), entfernt werden.

β) Verfahren von L. GRÜNHUT<sup>1</sup>. Er hat das Verfahren einer Nachprüfung unterzogen und der Untersuchung von Lebensmitteln angepaßt, und ferner zwecks Erreichung einer genauen Neutralisation der Titrierflüssigkeit gegen Lackmus, einer genauen Herstellung der Vergleichslösung und der Schlußtitrierung bis zum gleichen Farbton die Verwendung des Titriercoloriskops von H. LÜERS und L. ADLER<sup>2</sup> empfohlen.

Diesem Coloriskop (S. 205) werden seitens der Herstellerfirma<sup>3</sup> drei zugeschmolzene Fläschchen beigegeben, die folgenden  $[H^+]$ -Werten entsprechen:



Diese Farblösungen sind bei der ersten Anwendung und dann von Zeit zu Zeit auf ihre Richtigkeit zu prüfen, wenn man es nicht vorzieht, statt der Vergleichsfläschchen, deren Farbton allmählich abblaßt, nach dem Vorschlage von J. TILLMANS und H. KIESGEN<sup>4</sup> stets die betreffenden Pufferlösungen selbst zu verwenden. Über die Herstellung dieser Pufferlösungen siehe die Vorschriften von S. P. L. SÖRENSEN<sup>5</sup> sowie L. GRÜNHUT<sup>1</sup>.

Ausführung der Bestimmung. Die nötigenfalls nach FOLIN (S. 646) von Ammoniak sowie von Phosphaten und Carbonaten befreite Aminosäurelösung wird mit ausgekochtem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und nötigenfalls filtriert. Von dem Filtrat gibt man je 20 ccm in die Coloriskopzylinder A und B. Der Inhalt von A dient zum Titrieren, der von B als Hilfsmittel bei der Farbvergleichung. Zu A gibt man 2 ccm der vorgeschriebenen Neutralrotlösung<sup>6</sup> und versetzt tropfenweise mit N.-Salzsäure, bis ein Farbumschlag kenntlich zu werden beginnt. Die gleiche Tropfenzahl und außerdem einen geringen Überschuß gibt man in B. Darauf setzt man den Zylinder C mit der Vergleichslösung „Neutralrot“ ( $[H^+] = 10^{-7,07}$ ) in den in Abb. 1 mit C bezeichneten Raum des Coloriskops, ferner die Zylinder A und B sowie den Zylinder D in die mit den gleichen Buchstaben bezeichneten Räume.

Nun fügt man zu A aus einer Bürette unter Umrühren tropfenweise 0,1 N.-Salzsäure, bis beim Hindurchsehen in den Pfeilrichtungen links und rechts der gleiche Farbton erreicht ist. Bei etwaigem Übertitrieren kann man mit 0,1 N.-Natronlauge zurücktitrieren.

Die so gegen Neutralrot neutralisierte Flüssigkeit A dient jetzt zur Formoltitrierung. Man gibt in B 2 ccm Neutralrotlösung und außerdem tropfenweise soviel 0,1 N.-Natronlauge, daß die Flüssigkeit deutlich gelb gefärbt ist. Ferner vertauscht man jetzt C<sub>1</sub> mit der Vergleichslösung C<sub>2</sub> „Phenolphthalein dunkelrot“ ( $[H^+] = 10^{-9,1}$ ). Nunmehr gibt man zu A 10 ccm einer mit 10 Vol.-% Phenolphthaleinlösung<sup>7</sup> versetzten 40%igen Formaldehydlösung, die man unmittelbar vorher mittels 0,1 N.-Natronlauge auf Blaßrosa ausneutralisiert hat, und außerdem 2 ccm Phenolphthaleinlösung. Man titriert nun — unbeschadet einer zunächst sich bisweilen zeigenden, durch das Neutralrot bedingten Rotfärbung, die später wieder einer Gelbfärbung Platz macht — mittels 0,1 N.-Natronlauge bis zum eben auf-

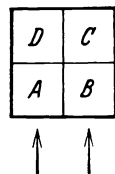


Abb. 1.  
Grundriß des  
Coloriskops.

<sup>1</sup> L. GRÜNHUT: Z. 1919, 37, 304.

<sup>2</sup> Der Apparat ist aus dem Acidimeter von H. LÜERS (Zeitschr. ges. Brauwesen 1914, 37, 334) hervorgegangen und von L. ADLER (Zeitschr. ges. Brauwesen 1915, 38, 241) beschrieben und zur Formoltitrierung verwendet.

<sup>3</sup> Das Titriercoloriskop wird von F. Hellige & Co. in Freiburg i. B. geliefert.

<sup>4</sup> J. TILLMANS u. H. KIESGEN: Z. 1927, 53, 126.

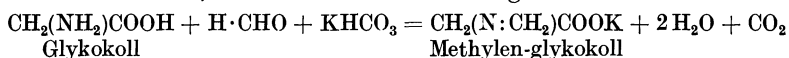
<sup>5</sup> S. P. L. SÖRENSEN: Biochem. Zeitschr. 1909, 21, 167.

<sup>6</sup> 0,2 g Neutralrot extra (Kahlbaum) in 1 Liter neutralem 50%igem Alkohol gelöst. Die Lösung ist in einer braunen Flasche monatelang unverändert haltbar.

tretenden Phenolphthaleinumschlag. Jetzt fügt man zu *B* so viel Wasser hinzu, daß das darin enthaltene Flüssigkeitsvolumen dem in *A* gleich ist, und titriert nunmehr *A* mit 0,1 N.-Natronlauge zu Ende, d. h. bis im Coloriskop Farbgleichheit erkannt wird.

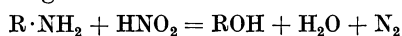
In einem Leerversuch werden in einem neuen Titrierzylinder 10 ccm der vorher verwendeten phenolphthaleinhaltigen, neutralisierten Formaldehydlösung mit soviel ausgekochtem Wasser, daß das Volumen dem zuletzt in *A* vorhandenen gleich ist, und ferner mit 2 ccm Phenolphthaleinlösung<sup>1</sup> versetzt. Man stellt dieses Glas in den Raum *D*, die Vergleichslösung „Phenolphthalein dunkelrot“ in den Raum *C* des Coloriskops und titriert den Inhalt von *D* mit 0,1 N.-Natronlauge bis auf Farbgleichheit mit *C*. Der Laugenverbrauch dieses Leerversuches ist von dem für *A* im Hauptversuch abzuziehen; die Differenz entspricht dem Aminosäure-Stickstoff in den 20 ccm der angewandten Lösung.

**b) Formolverfahren nach P. ASCHMARIN<sup>2</sup>.** Versetzt man eine Aminosäuren-Lösung im Gegensatz zu der neutralen Lösung unter a) mit Formaldehyd und viel Kaliumbicarbonat, so findet eine Umsetzung im Sinne der Gleichung

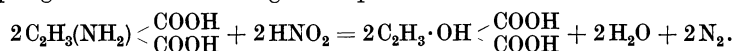


statt. Man bestimmt die entwickelte Kohlensäure gasometrisch. Der Apparat wird im voraus mit Kohlensäure gefüllt, um das im Kaliumbicarbonat etwa vorhandene Kaliumcarbonat vorher in Bicarbonat überzuführen.

**c) Nitritverfahren.** Aliphatische Aminosäuren reagieren mit Salpetriger Säure nach der Gleichung:



z. B. Asparaginsäure unter Bildung von Apfelsäure



Nach den Untersuchungen von D. D. VAN SLYKE<sup>3</sup> reagiert der Stickstoff der nur 1 Atom davon enthaltenden, natürlich vorkommenden Aminosäuren: Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, vollkommen mit Salpetriger Säure; ebenso reagieren beide Stickstoffatome des Lysins vollkommen. Dagegen reagiert von den 2 Stickstoffatomen des Tryptophans, den 3 des Histidins und den 4 des Arginins nur je eines mit Salpetriger Säure. Bei diesen Aminosäuren, deren Aminogruppen in  $\alpha$ -Stellung zum Carboxyl stehen, verläuft die Reaktion sehr schnell — bei der Anordnung von VAN SLYKE in etwa 5 Minuten —, während sie bei Lysin, Cytosin und ebenso bei Ammoniak, Harnstoff, Methylamin und den Purinen erst nach  $\frac{1}{2}$ —2 Stunden vollkommen verlaufen ist.

Bei Glykokoll und Cystin ist das Verfahren nicht anwendbar, weil bei der Reaktion neben dem Stickstoff noch ein anderes durch alkalische Permanganatlösung nicht oxydierbares Gas entsteht, so daß die Ergebnisse zu hoch (103—107%) werden.  $\text{NH}_2$ -Gruppen im Radikal, z. B. im Asparagin, werden durch die Reaktion nicht erfaßt.

Die Eignung der Reagenzien ist durch einen Leerversuch zu prüfen.

Für die Ausführung der Bestimmung, die zuerst von R. SACHSSE und W. KORMANN<sup>4</sup> vorgeschlagen wurde und für die C. BÖHMER<sup>5</sup> zuerst die noch jetzt gebräuchliche alkalische Permanganatlösung anwandte, sind die verschiedensten Apparate und Verfahren vorgeschlagen worden, von denen im nachfolgenden die von J. KÖNIG und A. SPLITTGERBER<sup>6</sup> sowie die von D. D. VAN SLYKE näher beschrieben seien.

<sup>1</sup> 0,5 g Phenolphthalein in 1 Liter neutralem 50%igem Alkohol.

<sup>2</sup> P. ASCHMARIN: Arch. Sciences biol., St. Petersburg (russ.) 1924, **23**, 347; C. 1926, I, 3418.

<sup>3</sup> D. D. VAN SLYKE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, **43**, 3170; 1911, **44**, 1684.

<sup>4</sup> R. SACHSSE u. W. KORMANN: Landw. Vers.-Stationen 1874, **17**, 321.

<sup>5</sup> C. BÖHMER: Landw. Vers.-Stationen 1883, **29**, 247.

<sup>6</sup> J. KÖNIG u. A. SPLITTGERBER: Z. 1909, **18**, 497. — Der Apparat kann von Fr. Hengershoff in Leipzig bezogen werden.

Verfahren von J. KÖNIG und A. SPLITTGERBER. Es wird, wie folgt, ausgeführt: Man bringt die zu untersuchende Lösung in den etwa 400 ccm fassenden Kolben *A* (Abb. 2), macht sie mit Alkalilauge schwach alkalisch und setzt 2 g Natriumnitrit hinzu. Darauf wird der Kolben *A* bis etwa zur Hälfte mit Wasser aufgefüllt, der dreifach durchbohrte Stopfen aufgesetzt, das Rohr *a* mit einem Kohlensäureentwicklungsapparat verbunden und bis zur vollständigen Entfernung der Luft aus dem Kolben *A* Kohlensäure eingeleitet. Nachdem dies geschehen ist, wird die Kohlensäureentwicklung unterbrochen und der Kolben *A* durch das Rohr *c* schnell mit dem Capillarrohr *d* verbunden, das ebenso wie das ganze Eudiometer *B* mit einer alkalischen konz. Kaliumpermanganatlösung<sup>1</sup> gefüllt ist. Nunmehr läßt man durch den Tropftrichter *b* vorsichtig verd. Schwefelsäure (1 + 3) in den Kolben *A* tropfen, worauf alsbald eine lebhaft Gasentwicklung eintritt. Das Gas sammelt sich in der Absorptionsröhre *B* an und verdrängt eine entsprechende Menge

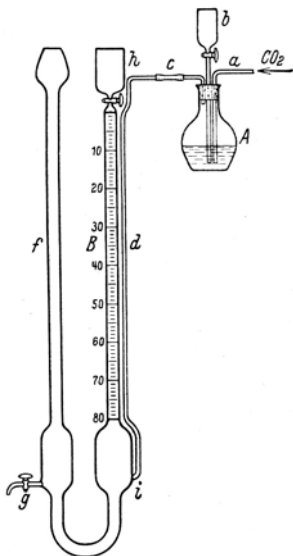


Abb. 2. Apparat nach KÖNIG und SPLITTGERBER.

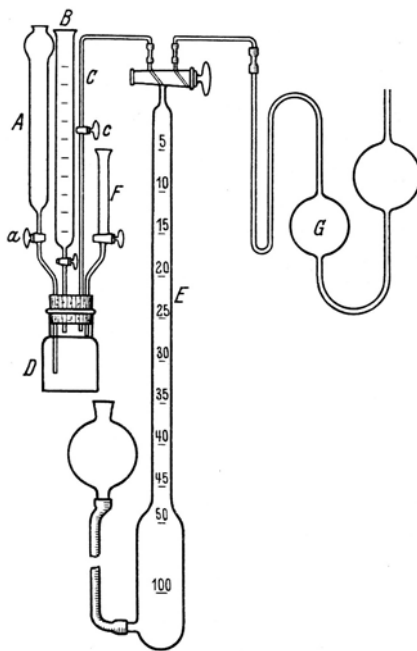


Abb. 3. Apparat nach VAN SLYKE.

Permanganatlösung, die man aus dem an dem engeren Rohre *f* des Eudiometers angebrachten Hahn *g* ausfließen läßt. Diese ausgelassene Flüssigkeit wird, wenn das Gas in dem Rohre *B* einen größeren Raum eingenommen hat, durch den Hahntrichter *h* wieder in den weiteren Schenkel *B* zurückgegeben, wodurch eine weitere Absorption der darin vorhandenen Kohlensäure und des Stickoxydgases stattfindet. Durch Schütteln des Kolbens *A* wird die Reaktion leicht beendet. Ist dies der Fall, so füllt man den Kolben *A* und schließlich auch die Capillare *d* bis zum Punkte *i* ganz mit ausgekochtem Wasser und treibt so das gesamte Gas in die Absorptionsröhre *B* hinein, gibt dann, um alles Stickstoffoxyd und alle Kohlensäure zu entfernen, durch den Hahntrichter *h* noch mehrmals alkalische Permanganatlösung in die Bürette, stellt schließlich das Niveau in beiden Schenkeln auf gleiche Höhe ein, wartet einige Zeit und liest, wenn kein Niveauunterschied mehr wahrnehmbar ist, das Gasvolumen sowie Barometerstand und Temperatur ab.

Die Hälfte des auf diese Weise gefundenen Stickstoffs (vgl. Formel S. 619) entstammt den Aminosäuren.

Es entsprechen demnach z. B. rund:

28 g Stickstoff = 133 g Asparaginsäure = 131 g Leucin = 181 g Tyrosin oder  
1 g Stickstoff = 4,75 g Asparaginsäure = 4,68 g Leucin = 6,46 g Tyrosin.

<sup>1</sup> Diese Lösung wird in der Weise hergestellt, daß man die erforderliche Wassermenge mit einem Überschuß von Kaliumpermanganat sowie einigen Gramm Kalium- oder Natriumhydroxyd versetzt und unter zeitweiligem Umrühren oder Umschütteln kurze Zeit stehen läßt.

Verfahren von D. D. VAN SLYKE<sup>1</sup>. Das Verfahren der Aminosäurebestimmung wurde von VAN SLYKE weiter ausgebaut, so daß die Bestimmung in wenigen Minuten ausgeführt werden kann und die Verwendung von Kohlensäure nicht erforderlich ist. Der Analysenfehler beträgt bei sorgfältigem Arbeiten nur  $\pm 0,05$  mg Stickstoff. Die zu untersuchende Lösung enthält zweckmäßig nicht mehr als 20 mg Aminostickstoff. Der Apparat ist in Abb. 3 dargestellt<sup>2</sup>.

Die Reaktion wird in der 35—37 ccm fassenden Flasche *D* ausgeführt. Die aus *D* hervorragenden Glasröhren sind Capillaren von 6—7 mm äußerem Durchmesser und 1 mm Lumen; nur das nach *A* führende Rohr hat 2 mm Lumen. Damit die Gasbürette rein bleibt, enthält das Sperrwasser in *E* etwa 1% Schwefelsäure. Zuerst befindet sich die Lösung der Aminoverbindung in der Bürette *B* und etwa 5 ccm Wasser in *A*. In die Flasche *D* gibt man 28 ccm Nitritlösung (3 Teile Natriumnitrit in 10 Teilen Wasser) und danach 7 ccm Eisessig, worauf sich sofort Stickoxyd entwickelt. Jetzt bringt man den *A*, *B* und *C* enthaltenden Stopfen in den Flaschenhals, bindet ihn mittels eines Drahtes fest und öffnet den Hahn *a*, worauf das Wasser aus *A* nach *D* fließt und die Luft aus *D* durch *C* hinausgedrängt wird. Um auch die in der Nitritlösung gelöste Luft auszutreiben, schließt man den Hahn *c*, öffnet *a* und schüttelt die Flasche *D*, wodurch infolge der starken Stickoxydentwicklung 10—15 ccm Flüssigkeit in *A* zurückgedrückt werden. Sodann öffnet man *c* wieder und drängt das Gas zusammen mit der aus der Flüssigkeit ausgewaschenen Luft durch *C* hinaus. Um die Luft ganz sicher vollständig zu entfernen, wiederholt man diese Operation. Danach erzeugt man durch Schließen von *c* und Schütteln der Flasche *D* in dieser einen Gasraum von etwa 20 ccm, schließt *a*, öffnet *c* und verbindet mit der Gasbürette *E*.

Jetzt läßt man die Aminostickstofflösung (10 ccm) aus *B* in *D* einfließen und vermischt die Flüssigkeiten in *D*, worauf sofort starke Entwicklung von Stickstoff, gemischt mit Stickoxyd, eintritt. Durch Schütteln der Flasche *D* (4—5mal je Minute) ist die Reaktion in 4—5 Minuten beendet, man führt sie aber solange fort, bis 30—40 ccm Stickoxydüberschuß über das zu erwartende Stickstoffvolumen in der Gasbürette angesammelt sind.

Sodann verdrängt man durch Öffnen von *a* und Einlassen der Flüssigkeit aus *A* in *D* alles Gas aus *D* und *C* nach *E* herüber. Aus *E* treibt man das Gasgemisch in die HEMPEL-Absorptionspipette *G*, in welcher sich eine mit Kaliumpermanganat gesättigte 2,5%ige Natronlauge befindet, welche beim Schütteln das Stickoxyd absorbiert. Darauf wird der reine Stickstoff nach *E* zurückgetrieben und gemessen.

Der kleine Tropftrichter *F* wird nur bei Analysen zäher Flüssigkeiten, wie Proteinlösungen, verwendet, indem man durch ihn wenige Tropfen Amylalkohol zur Verhinderung des Schäumens zufließen läßt.

Wenn man die Aminolösung nicht durch Auflösung in ausgekochtem Wasser hergestellt oder sie durch Schütteln im luftleeren Raum von Luft befreit hat, so muß man für die 10 ccm Aminolösung 0,16 ccm vom gefundenen Stickstoffvolumen in Abzug bringen.

Über die Berechnung des Aminostickstoffgehaltes siehe oben S. 620. 1 mg Aminostickstoff liefert je nach Druck und Temperatur 1,7—1,9 ccm Stickstoffgas.

D. KLEIN<sup>3</sup> hat dem VAN SLYKESchen Apparat eine abgeänderte Form (Abb. 4) gegeben.

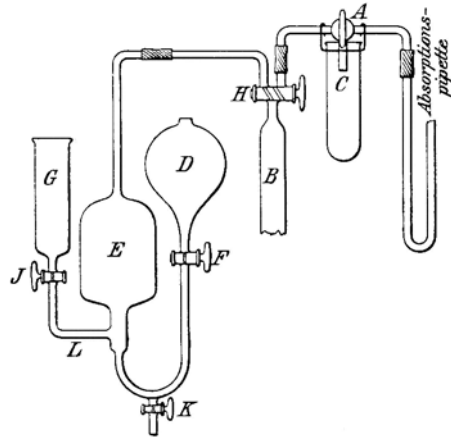


Abb. 4. Apparat nach D. KLEIN.

<sup>1</sup> D. D. VAN SLYKE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, 43, 3170; 1911, 44, 1684. — Vgl. ferner VAN SLYKE: Journ. Biol. Chem. 1913, 16, 121 (Apparat für Mikrobestimmung); 1915, 22, 281; 23, 407; C. 1914, I, 684; 1915, II, 1217; 1916, I, 353.

<sup>2</sup> Der Apparat wird von R. Götze-Leipzig und von E. Machlett and Son-New York, 143 East 43 St., geliefert. — F. C. KOCH (Journ. Biol. Chem. 1929, 84, 601; C. 1930, I, 1831) hat einen abgeänderten Apparat empfohlen.

<sup>3</sup> D. KLEIN: Journ. Biol. Chem. 1911, 10, 287; H. MEYER: Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen. 5. Aufl., S. 524. Berlin: Julius Springer 1931.

Die Flüssigkeit wird von der Absorptionspipette durch den Dreiweghahn *A* gesaugt, der dann so eingestellt wird, daß er mit der Gasbürette *B* und der Luft bei *C* in Verbindung steht. Das Reservoir *D* wird mit 28 ccm Nitritlösung gefüllt und durch Senken der Niveaueugel der Gasbürette nach *E* gebracht und zwar so, daß noch ein wenig Flüssigkeit über dem Hahn *F* stehen bleibt. Die Luft in *B* wird durch *A* hinausgeleitet, wobei es nicht nötig ist, die Capillare mit Flüssigkeit zu füllen.

Die zu untersuchende Flüssigkeit wird in *G* eingefüllt. Dann werden 7 ccm Eisessig in *D* eingegossen und durch Senken der Niveaueugel nach *E* gebracht, wobei etwas Säure über *F* zurückbleiben muß. Das entwickelte Gas verdrängt die Luft in *E*. Haben sich etwa 45 bis 50 ccm Gas in der Bürette *B* gesammelt, so wird *H* geschlossen und *F* geöffnet. Es bildet sich dann bald in *E* ein Gasraum von genügender Größe. Unterdessen treibt man das Gas aus *B* durch *A* aus, füllt die Capillare mit Flüssigkeit und läßt den Überschuß in *C* ablaufen. *H* wird nun geschlossen und *A* so gedreht, daß Verbindung zwischen *B* und der Absorptionspipette entsteht.

Man schließt nun *F* und läßt die Flüssigkeit von *G* nach *E* ein, wobei darauf zu achten ist, daß nichts davon unterhalb des Hahnes *J* austritt. Nun wird *J* geschlossen, *G* mit wenig Wasser ausgespült, das wieder nach *E* abgelassen wird. Dies wird zwei- bis dreimal wiederholt.

Hat die Reaktion 5 Minuten<sup>1</sup> gedauert, so wird aus *D* so viel Flüssigkeit nach *E* getrieben, bis sie *H* erreicht. Dann wird das Gas aus *B* in die Absorptionspipette getrieben, bis die Säurelösung die Capillaren der Pipette erfüllt. Die zur Absorption des Stickoxyds erforderliche Zeit wird durch Schütteln der Pipette während der Durchleitung des Gases abgekürzt.

Das unabsorbierte Gas wird nach *B* zurückgetrieben, so daß die Permanganatlösung bis *H* reicht, und das Gas gemessen.

Falls es zur Vermeidung des Schäumens notwendig sein sollte, Amyl- oder Oktylalkohol zuzusetzen, kann er vor dem Einlassen der zu untersuchenden Flüssigkeit durch *D* oder *G* nach *E* gebracht werden.

Die Reinigung des Apparates geschieht durch Ablassen der Flüssigkeit bei *K* und zwei- oder dreimaliges Waschen mit Wasser, das bei *G* und *D* eingefüllt und nach *E* eingelassen wird.

d) Acidimetrisches Verfahren nach J. TILLMANS und J. KIESGEN<sup>2</sup>. R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>3</sup> wiesen zuerst darauf hin, daß Aminosäuren, die in wäßriger Lösung amphoter reagieren, in stark alkoholischen Lösungen Säuren werden, die ohne weiteres gegen Phenolphthalein titriert werden können. Wählt man Thymolphthalein als Indicator, so kann man nach L. J. HARRIS<sup>4</sup> noch bei Lösungen mit 75—80% Alkohol richtige Werte erhalten und infolgedessen mit wäßriger Lauge titrieren<sup>5</sup>.

Nach TILLMANS und KIESGEN werden 5 ccm der zu titrierenden neutralen Aminosäurelösung mit 50 ccm neutralisiertem<sup>6</sup> 96%igem Alkohol versetzt, 0,5 ccm alkoholische 0,4%ige Thymolphthaleinlösung hinzugefügt und mit 0,1 N.-Natronlauge auf den ersten blauen Ton titriert.

Weitere 5 ccm der Aminosäurelösung werden mit 0,1 N.-Natronlauge oder 0,1 N.-Salzsäure unter Verwendung der Phosphatpufferlösung (S. 625) mit Neutralrot auf Stufe 7 titriert. Der so gefundene Wert ist von dem der Thymolphthaleintitration abzuziehen, wenn mit Natronlauge titriert werden mußte, dagegen zuzuzählen, wenn mit Salzsäure titriert werden mußte.

Enthält die zu untersuchende Aminosäurelösung Phosphate und Ammoniumsalze, so müssen diese vorher entfernt werden. Die Phosphate werden durch Zusatz von festem Bariumchlorid und einem Überschuß von Natronlauge ausgefällt und das Ammoniak nach FOLIN (S. 646) ausgeblasen und darauf die Lösung neutralisiert.

<sup>1</sup> Nach L. ROSENTHALER (Biochem. Zeitschr. 1929, 207, 298) sind bei Lysin  $\frac{1}{2}$  Stunde und bei anderen Stoffen mit einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe noch längere Zeiten bis zur Beendigung der Reaktion erforderlich.

<sup>2</sup> J. TILLMANS u. J. KIESGEN: Z. 1927, 53, 126.

<sup>3</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1921, 54, 2988.

<sup>4</sup> L. J. HARRIS: Proceed. Roy. Soc., London Serie B 1923, 95, 440, 500; C. 1924, I, 435, 1421.

<sup>5</sup> Das Verfahren liefert nach R. MARTENS (Bull. Soc. Chim. biol. 1927, 9, 454; C. 1927, II, 720) sehr genaue Ergebnisse.

<sup>6</sup> Zwecks Neutralisierung werden die 50 ccm Alkohol mit 0,5 ccm alkoholischer 0,4%iger Thymolphthaleinlösung und bis zum Umschlag mit 0,1 N.-Natronlauge versetzt.

Ist die zu untersuchenden Aminosäurelösung gefärbt — dunkeler als bernsteinfarbig —, so entfärbt man sie in saurer Lösung mit Tierkohle.

W. GRASSMANN und W. HEYDE<sup>1</sup> haben ein entsprechendes mikrochemisches Verfahren beschrieben.

e) **Stufentitration nach J. TILLMANS und J. KIESGEN<sup>2</sup>.** Das Verfahren beruht auf der Erkenntnis von P. HIRSCH<sup>3</sup>, daß sich sämtliche Aminosäuren durch eine Stufentitration von der Stufe 7 auf die Stufe 11,8 titrimetrisch bestimmen lassen (vgl. dazu S. 212). Ein für diese Titration geeigneter Indicator ist Tropäolin 0 in 0,1%iger wäßriger, filtrierter Lösung.

Als Pufferlösung für die Stufe 7 dient die nach GRÜNHUT, bestehend aus 6,2 ccm  $\frac{1}{15}$  N.-Kaliumdihydrophosphat und 3,8 ccm  $\frac{1}{15}$  N.-Natriummonohydrophosphat, und für die Stufe 11,8 eine Natronlauge, die je Kubikzentimeter 0,0668 ccm 0,1 N.-Natronlauge enthält und der man soviel Natriumchlorid<sup>4</sup> zusetzt, daß die Lösung einer N.-Natriumchloridlösung entspricht.

Die Titration erfolgt zweckmäßig in den Coloriskop nach LÜERS-ADLER (S. 205).

#### Ausführung der Bestimmung:

a) In reinen Aminosäurenlösungen. In den Zylinder *I* des Coloriskops bringt man 5 ccm der etwa 0,1-normalen Aminosäurenlösung, 20 ccm 2 N.-Natriumchloridlösung und 0,5 ccm Indicatorlösung und in den Zylinder *II* 25 ccm der Natronlauge für Stufe 11,8 und ebenfalls 0,5 ccm Indicatorlösung. Nun wird *I* durch Zusatz von 0,1 N.-Natronlauge auf Farbgleichheit mit *II* gebracht. Da eine bestimmte Laugenmenge gebraucht wird, um die Stufe 11,8 herbeizuführen, ist von der für *I* verbrauchten 0,1 N.-Natronlauge für je 1 ccm Endtitrationsvolumen 0,0668 ccm 0,1 N.-Natronlauge abzuziehen.

b) In Lebensmitteln. 5–10 g der Substanz<sup>5</sup> werden mit etwa 250 ccm heißem Wasser gelöst, 0,3 g Bariumchlorid<sup>6</sup> zugesetzt, nahezu neutralisiert und dann noch 10 ccm 2 N.-Natronlauge hinzugefügt. Darauf wird das Ammoniak nach FOLIN (S. 646)  $2\frac{1}{2}$  bis 3 Stunden ausgeblasen. Dann wird mit Salzsäure nahezu neutralisiert und die Lösung, falls sie dunkeler als bernsteinfarben ist, mit Tierkohle entfärbt<sup>7</sup>, filtriert und dann mit 2 N.-Natriumchloridlösung auf 100 ccm aufgefüllt. 50 ccm davon werden auf 300 ccm verdünnt.

Je 30 ccm dieser Verdünnung werden in die Zylinder *A* und *B* (Abb. 1, S. 618) gegeben, von denen *B* hinter die Vergleichslösung *C*, d. h. 30 ccm der Natronlauge von Stufe 11,8 mit etwa 1,8 g Natriumchlorid, d. h. bis zur n-Konzentration, gestellt wird. Sowohl die zu titrierende Lösung *A* als auch die Vergleichslösung *C* werden mit 0,5 ccm Tropäolinlösung versetzt und dann wird *A* mit 0,1 N.-Natronlauge auf Farbgleichheit mit *C* titriert. Um genaue Werte zu erhalten, setzt man im Coloriskop vor *A* den Zylinder *D*, der mit Wasser gefüllt ist, und gibt gegen Ende der Titration von *A* die verbrauchte Menge 0,1 N.-Natronlauge in die vor *C* gestellte Vorschaltflüssigkeit *B*<sup>8</sup>. Ferner gibt man zu *C* noch soviel Vergleichslösung von Stufe 11,8, als man bei der Titration von *A* an 0,1 N.-Natronlauge verbraucht hat. Dann ist die Titration von *A* auf Farbgleichheit mit *C* zu Ende zu führen.

Nun werden zu der fertig titrierten Flüssigkeit *A* 0,5 ccm wäßrige 0,2%ige Neutralrotlösung zugesetzt, als Vergleichslösung die Pufferlösung von Stufe 7 nach GRÜNHUT in den Zylinder *C* an Stelle der Natronlauge gegeben, je 0,5 ccm Tropäolin- und Neutralrotlösung zugesetzt und dann wird *A* mit 0,1 N.-Salzsäure auf Farbgleichheit mit *C* titriert.

<sup>1</sup> W. GRASSMANN u. W. HEYDE: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, 183, 32.

<sup>2</sup> J. TILLMANS u. J. KIESGEN: Z. 1927, 53, 126.

<sup>3</sup> P. HIRSCH: Biochem. Zeitschr. 1924, 147, 433.

<sup>4</sup> Der Zusatz von Natriumchlorid erfolgt zur Beseitigung des sog. Salzfehlers; er ist erforderlich, weil Lebensmittelauszüge vielfach viel Natriumchlorid enthalten.

<sup>5</sup> Bei Substanzen, die zum Teil in Wasser unlöslich sind, ein entsprechender wäßriger Auszug.

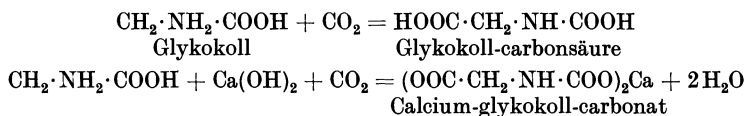
<sup>6</sup> Der Zusatz von Bariumchlorid erfolgt zur Ausfällung der die Bestimmung der Aminosäuren beeinträchtigenden Phosphorsäure.

<sup>7</sup> Die Entfärbung geschieht in der Weise, daß die Lösung mit Salzsäure schwach angesäuert, mit 2 g Tierkohle behandelt und darauf filtriert wird. Die Tierkohle absorbiert keine Aminosäuren.

<sup>8</sup> Der Zusatz der Natronlauge zu *B* erfolgt aus dem Grunde, weil unter Umständen der Farbton der zu untersuchenden Flüssigkeit in *A* in alkalischer Lösung ein anderer sein kann als in neutraler.



f) **Carbaminsäureverfahren nach M. SIEGFRIED<sup>1</sup>**. Bei Gegenwart von Alkalien und Erdalkalien werden Aminosäuren durch Einleiten von Kohlensäure in wasserlösliche zweibasische Carbaminsäuren bzw. deren Salze übergeführt nach den Formeln:



Die verdünnte Aminosäurenlösung (z. B. 0,1—0,5 g in 50 ccm Wasser) wird in Eiswasser gekühlt, mit einigen Kubikzentimetern Kalkmilch (200 g Calciumoxyd auf 1 l Wasser) versetzt, und unter öfterem Umschütteln wird Kohlensäure eingeleitet, bis einige Tropfen zugesetzte Phenolphthaleinlösung (in Kalkwasser) fast entfärbt werden. Diese Behandlung wird nach Zusatz von zuerst etwa 10 ccm und dann etwa 20 ccm Kalkmilch unter guter Kühlung und öfterem Umschütteln zweimal wiederholt. Dann wird rasch und ohne nachzuwaschen abgesaugt. Zum Filtrat gibt man etwa 150 ccm ausgekochtes Wasser und kocht in einem mit einem nach abwärts gebogenen Natronkalkrohr verschlossenen Kolben auf; die Lösung muß immer alkalisch bleiben. Das dabei aus den carbaminsäuren Kalksalzen abgeschiedene Calciumcarbonat wird in einem gewogenen Gooch-Tiegel abgesaugt, mit kaltem, ausgekochtem Wasser ausgewaschen, im Trockenschranke bei 120° getrocknet und gewogen.

Im Filtrat und Waschwasser wird der Stickstoff nach KJELDAHL bestimmt.

M. SIEGFRIED hat nach diesem Verfahren Glykokoll, Asparagin- und Carbaminsäure, Arginin, Histidin, Lysin, Kysine, Polypeptide und Peptone untersucht, die dabei mit je einer NH<sub>2</sub>-Gruppe reagieren. Das Verhältnis von N : CO<sub>2</sub> ist dabei bei Glykokoll und Lysin 1 : 1, bei Histidin 1 : 3 und bei Arginin 1 : 4. — Harnstoff und Guanidin reagieren nicht.

Zur Trennung von Aminosäuren eignen sich wegen ihrer Schwerlöslichkeit die Bariumsalze. Aus ihren Filtraten lassen sich nach Abscheidung des Bariumcarbonats die Aminosäuren leicht wieder darstellen.

g) **Ninhydrinverfahren nach H. RIFFART<sup>2</sup>**. Triketo-hydrinden-hydrat, das „Ninhydrin“ der Höchster Farbwerke, wurde zuerst von S. RUHEMANN<sup>3</sup> als Reagens auf Aminosäuren verwendet, mit denen es in neutraler Lösung eine Blaufärbung gibt. Die Reaktion tritt ein mit allen Aminosäuren, die neben einer freien Aminogruppe eine freie Carboxylgruppe besitzen. Da die Reaktion sehr empfindlich ist, eignet sie sich vor allem zur genauen Bestimmung kleiner Mengen aliphatischer Aminosäuren.

Prolin und Oxyprolin geben keine Ninhydrinreaktion, weil sie keine Amino-, sondern eine Iminogruppe besitzen. Säureamide geben die Reaktion nicht, ebensowenig Aldehyde, Ketone, Xanthin, Milchsäure. Ammoniak stört die Reaktion<sup>4</sup> und muß daher vorher entfernt werden. Zuckerlösungen geben eine gelbliche bis rötlichbraune Färbung und beeinflussen daher in größerer Konzentration das Ergebnis der Aminosäurenbestimmung. Ninhydrin reagiert noch mit einer ganzen Reihe organischer und auch anorganischer Stoffe. Bei unter 15 mg/l Stickstoff beeinflussen diese Verbindungen die Reaktion bzw. Bestimmung aber nicht. Eiweißstoffe geben mit Ninhydrin eine blauviolette Färbung; sie müssen daher vorher durch Dialyse oder durch Ultrafiltration entfernt werden.

Erforderliche Lösungen:

1. Asparaginsäure- und (je nach Wahl) Alanin-, Glykokoll- oder Leucin-Vergleichslösungen in den Konzentrationen: 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 mg Aminosäuren-Stickstoff im Liter;

<sup>1</sup> M. SIEGFRIED: Zeitschr. physiol. Chem. 1905, 44, 85; 1906, 46, 401; 1907, 52, 506. — M. SIEGFRIED u. C. NEUMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1908, 54, 423.

<sup>2</sup> H. RIFFART: Biochem. Zeitschr. 1922, 131, 78 und Z. 1922, 44, 225.

<sup>3</sup> S. RUHEMANN: Journ. Chem. Soc. London 1910, 97, 1438, 2025; 1911, 99, 792; C. 1910, II, 812; 1911, I, 149, 1845.

<sup>4</sup> Vgl. H. GARDNER: Lancet 1930, 219, 525; C. 1930, II, 2925.

2.  $m/_{15}$  Kalium-dihydrophosphat-Lösung<sup>1</sup>, enthaltend 9,078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  im Liter;
3.  $m/_{15}$  Natrium-monohydrophosphat-Lösung<sup>1</sup>, enthaltend 11,876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  im Liter;
4. Neutralrot-Lösung nach SÖRENSEN, enthaltend 0,1 g Neutralrot im Liter 50 vol. %igen Alkohols; in brauner Flasche aufzubewahren.
5. 0,1, 0,01 und 0,0025 N.-Natronlauge und -Schwefelsäure;
6. Wäßrige 1%ige Ninhydrinlösung<sup>2</sup>, jedesmal frisch herzustellen und in brauner Flasche aufzubewahren. Das zur Herstellung der Lösung benutzte Wasser muß kohlenstofffrei und daher nach L. MICHAELIS<sup>3</sup> in einem alten, oft gebrauchten Glaskolben ausgekocht sein.
7. Aminosäure-Vergleichslösungen. Man bereitet sich Lösungen, die 100 mg Aminosäure-Stickstoff im Liter enthalten; für 500 ccm sind abzuwägen:

| Asparaginsäure | Alanin | Leucin | Glykokoll |
|----------------|--------|--------|-----------|
| 0,4753         | 0,3179 | 0,4678 | 0,2678 g. |

Aus diesen Lösungen werden durch Verdünnen von 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 und 3 ccm auf 100 ccm die einzelnen Vergleichskonzentrationen hergestellt. In den meisten Fällen wird man mit Asparaginsäurelösungen auskommen. Liegen Lösungen mit unbekanntem Aminosäuren vor, so ist bei etwa auftretenden Farbenunterschieden die Vergleichslösung entsprechend zu wählen. Um eine Zersetzung der Vergleichslösungen zu verhindern, werden diese mit Toluol überschichtet im Eisschrank aufbewahrt; sie sind dann nach 2 Monaten noch nicht verändert. Die Phosphat-Puffermischung [ $\text{H}^+ = 10^{-6,976}$ ] wird aus 2 Thn. der  $m/_{15}$  Kalium- und 3 Thn. der  $m/_{15}$  Natriumphosphatlösung jedesmal frisch hergestellt und mit Neutralrot versetzt.

Ausführung der Bestimmung. Je 2 ccm der Vergleichslösungen, der zu untersuchenden, nicht mehr als 20 mg/l enthaltenden Lösung<sup>4</sup> und der Phosphatmischung  $\text{H}^+ = 10^{-6,976}$  werden in gut gereinigte trockene Reagensgläser pipettiert. Dann gibt man zu allen Lösungen 0,05 ccm der Neutralrotlösung, schwenkt vorsichtig einmal um und stellt mit Lauge bzw. Säure auf die Färbung der Phosphatvergleichslösung ein. Bei den Aminosäurevergleichslösungen bedarf es dazu nur weniger Tropfen 0,0025 N.-Lauge; ist die  $\text{H}^+$ -Konzentration der zu untersuchenden Lösung unbekannt, so ermittelt man zunächst durch einen Vorversuch die zur Neutralisation erforderliche Menge an Lauge oder Säure. Dann verfährt man zweckmäßig so, daß je nach der  $\text{H}^+$ -Konzentration tropfenweise 0,1, 0,01 oder 0,0025 N.-Lauge bzw. Säure bis zum Farbumschlag zugegeben werden; wurden 0,1 oder 0,01 N.-Lösungen verwendet, so ist mit der nächst schwächeren Lösung bis zum neuen Farbumschlag zurückzutitrieren, bis mit 0,0025 N.-Lösung die Neutralisation endgültig erreicht ist. Bei der Neutralisation ist darauf zu achten, daß die Mischungen dadurch eine nicht zu große Verdünnung erfahren.

Zu den so neutralisierten Lösungen gibt man dann je 2 ccm der Phosphatmischung sowie 1 ccm der 1%igen Ninhydrinlösung, schüttelt gut um und bringt die Reagensgläser in einem Einsatz in ein lebhaft siedendes Wasserbad. Es wird solange erhitzt, bis die 3 mg/l Aminosäure-Stickstoff enthaltende Vergleichslösung eben anfängt, sich blauviolett zu färben (gewöhnlich nach  $\frac{1}{2}$ stündigem Erhitzen); man überzeugt sich davon, indem man den Einsatz<sup>5</sup> aus dem Wasserbade heraushebt und die Färbungen betrachtet. Nach dem Erhitzen werden die Reaktionsmischungen bei gewöhnlicher Temperatur abgekühlt und nach  $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen in Standzylindern aus farblosem Glas und mit genau gleicher Einteilung auf 100 ccm verdünnt. Auf weißem Hintergrunde wird dann an Hand der Vergleichsfärbungen der Gehalt der zu untersuchenden Lösung an Aminosäuren-Stickstoff festgestellt.

## B. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Aminosäuren.

Sofern in der zu untersuchenden Substanz nur eine einzelne Aminosäure vorhanden ist, können zu ihrem Nachweis die oben unter A 1 (S. 615) aufgeführten Verfahren verwendet werden und zur Identifizierung der einzelnen

<sup>1</sup> „Kalium- bzw. Natriumphosphat zu Enzymstudien nach SÖRENSEN“ von C. A. F. Kahlbaum in Adlershof bei Berlin.

<sup>2</sup> Ninhydrin wird von den Höchster Farbwerken in Ampullen von 0,1 g Inhalt geliefert.

<sup>3</sup> L. MICHAELIS: Die Wasserstoffionenkonzentration, S. 171. Berlin 1914.

<sup>4</sup> Liegen keine Anhaltspunkte über den annähernden Gehalt der Lösung an Aminosäuren-Stickstoff vor, so sind außer der unverdünnten Lösung auch die Verdünnungen 1 : 5, 1 : 25 und 1 : 125 usw. zur Untersuchung heranzuziehen.

<sup>5</sup> Einzelne Reagensgläser dürfen während des Erhitzens nicht — auch nur vorübergehend nicht — aus dem Wasserbade genommen werden, weil die Ninhydrinreaktion in starkem Maße von der Zeit der Erhitzung abhängig ist.

Aminosäuren die Schmelzpunkte der dort unter 1c und d aufgeführten Verbindungen, ferner auch die der Pikrate und Pikrolonate dienen, die in der Tabelle auf S. 616 zusammengestellt sind.

Zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren können die oben unter A 2 (S. 617) aufgeführten Verfahren verwendet werden, wenn in der zu untersuchenden Lösung nur eine einzelne Aminosäure vorhanden ist.

Im übrigen sind die allgemeinen Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren und die zum Nachweis und zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren in Vorschlag gebrachten mehr oder weniger spezifischen Verfahren<sup>1</sup> folgende:

### 1. Monoamino-monocarbonsäuren.

**a) Glykokoll** (Amino-essigsäure, Glycin),  $C_2H_5NO_2 = NH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ , ist in etwa 4 Tln. Wasser löslich, kaum löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, Petroläther usw.; süß schmeckend; durch Phosphorwolframsäure in 2%iger und konz. Lösungen fällbar.

**Nachweis.**  $\alpha$ ) Nach A. KOSSEL und S. EDLBACHER<sup>2</sup> führt man das Glykokoll, wie S. 615 angegeben, in Hippursäure (Benzoylglykokoll) über und weist diese nach P. HAAS<sup>3</sup> wie folgt nach: Man überschiebt die feingepulverte Substanz und etwas roten Phosphor mit einigen Tropfen Chloroform, fügt tropfenweise Brom mit geringem Überschuß hinzu, erwärmt, bis alles gelöst ist, kocht mit einigen Kubikzentimeter Wasser, bis Brom und Chloroform entfernt sind, fügt zur kalten Lösung etwas Protein hinzu und unterschichtet das Gemisch mit konz. Schwefelsäure, worauf bei Gegenwart von Glykokoll eine violette Färbung (Glyoxylsäurereaktion) auftritt.

$\beta$ ) Nach W. ZIMMERMANN<sup>4</sup> versetzt man die zu prüfende Lösung mit 10 Tropfen 2 N.-Natronlauge und 8 Tropfen wäßriger o-Phthal-dialdehyd-Lösung, schüttelt um und gibt nach etwa 20 Sekunden 19 Tropfen konz. Salzsäure hinzu. Bei Gegenwart von Glykokoll entsteht sofort eine starke rotviolette bis violette Färbung bzw. ein solcher Niederschlag. Etwa vorhandene Diaminosäuren, welche die Reaktion ebenfalls geben, werden vorher durch Fällung mit Phosphorwolframsäure in verdünnter Lösung, Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Baryt und des letzteren mit Kohlensäure entfernt.

$\gamma$ ) Zum Nachweise des Glykokolls neben anderen Aminosäuren ist das Äthylesterhydrochlorid, neben Alanin sind auch das Silbersalz, das Pikrat und das Carbinamessigsäure Barium geeignet.

**Bestimmung.** G. KLEIN und H. LINSER<sup>5</sup> haben die Reaktion zum Nachweise von Glykokoll mit o-Phthal-dialdehyd ( $\alpha\beta$ ) zu einem colorimetrischen Bestimmungsverfahren ausgearbeitet und bestimmen dabei den neben anderen Farbstoffen entstehenden, mit Chloroform ausschüttelbaren grünen Farbstoff.

**b) d-Alanin** ( $\alpha$ -Amino-propionsäure),  $C_3H_7NO_2 = CH_3 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist in 4,6 Tln. Wasser von 17<sup>0</sup> und in 500 Tln. Alkohol (80%) löslich. Beim Erhitzen für sich und mit konz. Phosphorsäure auf 220<sup>0</sup> entsteht Acetaldehyd; in konz. Lösung durch Phosphorwolframsäure fällbar.

**c) d-Valin** ( $\alpha$ -Amino-iso-valeriansäure),  $C_5H_{11}O_2N = (CH_3)_2CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist in etwa 11 Tln. Wasser löslich; Geschmack bitter und schwach süß.

Über die Trennung von Valin und Leucin mittels Bleiacetat und Ammoniak siehe P. A. LEVENE und W. A. BEATTY<sup>6</sup>, sowie P. A. LEVENE und D. D. VAN SLYKE<sup>7</sup>, ferner über die Trennung von Valin, Leucin und Isoleucin P. A. LEVENE und D. D. VAN SLYKE<sup>8</sup>.

**d) l-Leucin** ( $\alpha$ -Amino-isobutyl-essigsäure),  $C_6H_{13}O_2N = (CH_3)_2CH \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist in etwa 40 Tln. Wasser löslich, dagegen in Alkohol sehr schwer löslich.

<sup>1</sup> Vgl. Anmerkung 1 auf S. 615.

<sup>2</sup> A. KOSSEL u. S. EDLBACHER: Zeitschr. physiol. Chem. 1919, 107, 45.

<sup>3</sup> P. HAAS: Journ. Chem. Soc. London 1912, 101, 1254; C. 1912, II, 1452.

<sup>4</sup> W. ZIMMERMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 189, 4; C. 1930, II, 275.

<sup>5</sup> G. KLEIN u. H. LINSER: Zeitschr. physiol. Chem. 1932, 205, 251.

<sup>6</sup> P. A. LEVENE u. W. A. BEATTY: Biochem. Zeitschr. 1907, 4, 305.

<sup>7</sup> P. A. LEVENE u. D. D. VAN SLYKE: Biochem. Zeitschr. 1908, 13, 440.

<sup>8</sup> P. A. LEVENE u. D. D. VAN SLYKE: Journ. Biol. Chem. 1909, 6, 391; C. 1909, II, 1754.

Das Kupfersalz ist sehr schwer löslich in Wasser (1 Tl. in 3045 Tln. kaltem Wasser); infolgedessen gibt eine siedend heiße Leucinlösung mit einer ebensolchen Lösung von Kupferacetat einen Niederschlag. — Sehr empfindlich ist die Uraninsäurereaktion von F. LIPPICH<sup>1</sup>, wobei sich Leucinursäure bildet.

e) **d-Isoleucin** ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methyl- $\beta$ -äthyl-propionsäure),  $C_6H_{13}NO_2 = (CH_3) \cdot (C_2H_5) \cdot CH \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist in 26 Tln. Wasser (15,5<sup>0</sup>) löslich, dagegen in heißem Alkohol nur sehr wenig löslich.

Das Kupfersalz ist leichter löslich als das des Leucins; es löst sich in 278 Tln. Wasser (17<sup>0</sup>) und in 55 Tln. Methylalkohol. Zur Trennung von Leucin kocht man die Kupfersalze mit heißem Methylalkohol, wobei das Kupfersalz des Isoleucins sich löst<sup>2</sup>.

f) **l-Phenylalanin** ( $\beta$ -Phenyl- $\alpha$ -amino-propionsäure),  $C_9H_{11}NO_2 = C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist löslich in 33 Tln. Wasser (25<sup>0</sup>) und fast unlöslich in Alkohol.

g) **l-Tyrosin** ( $\beta$ -p-Oxyphenyl- $\alpha$ -amino-propionsäure),  $C_9H_{11}NO_3 = C_6H_4(OH) \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist löslich in 2450 Tln. Wasser (17<sup>0</sup>), schwer löslich in Alkohol und Eisessig. l-Tyrosin wird durch Phosphorwolframsäure und die sonstigen Alkaloidreagenzien nicht gefällt.

**Nachweis.**  $\alpha$ ) Tyrosin ist der die MILLONsche und die Xanthoproteinreaktion der Proteine (S. 605) verursachende Stoff; es kann daher durch diese Reaktionen nachgewiesen werden. Tyrosin gibt auch die Diazoreaktion von H. PAULY<sup>3</sup> (Bd. I, S. 141). Nach K. INOUE<sup>4</sup> tritt diese Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure nicht ein, wenn man die zu untersuchende Lösung vorher bei einem Überschuß von Natriumcarbonat mit Benzoylchlorid schüttelt (Unterschied von Histidin).

$\beta$ ) Reaktion mit Form- und Acetaldehyd und Schwefelsäure nach G. DENIGÈS<sup>5</sup>. 2 ccm konz. Schwefelsäure werden mit 3—5 Tropfen einer Lösung von 5 ccm Acetaldehyd und 10 ccm Alkohol (90%) sehr vorsichtig unter Schütteln nach jedem Tropfen gemischt, dann einige Tropfen der auf Tyrosin zu prüfenden Lösung zugegeben und wieder geschüttelt. Bei Gegenwart von Tyrosin tritt eine mehr oder weniger starke johannisbeerrote Färbung ein; Empfindlichkeit: 0,01 mg. — Setzt man zu 2—3 ccm einer Lösung von 1 ccm Formaldehyd in 50 ccm konz. Schwefelsäure wenig Tyrosin, so entsteht bei 50—60<sup>0</sup> sofort eine braungelbe, allmählich rötliche Färbung, welche beim Kochen mit dem gleichen Volumen Eisessig in Grün übergeht. Nach C. TH. MÖRNER<sup>6</sup> setzt man zu der auf Tyrosin zu prüfenden Lösung einige Kubikzentimeter einer Mischung von 1 Vol. Form aldehyd (40%), 45 Vol. Wasser und 55 Vol. konz. Schwefelsäure und erhitzt zum Sieden; die Lösung färbt sich bei Gegenwart von Tyrosin dauernd grün.

**Bestimmung.** G. DENIGÈS<sup>5</sup> verwendet die obige Reaktion mit Acetaldehyd zur colorimetrischen Bestimmung geringer Mengen Tyrosin durch Vergleich mit Lösungen von bekanntem Tyrosingehalt. — O. FOLIN und V. CIOCALTEU<sup>7</sup> benutzen das MILLONsche Reagens zum colorimetrischen Vergleich mit entsprechenden Tyrosinlösungen. — M. T. HANKE<sup>8</sup> fällt das Tyrosin mit Quecksilberacetat als Tyrosinquecksilberchlorid und trennt es damit von anderen Aminosäuren. Der Niederschlag wird durch Salz- oder Schwefelsäure gelöst, die Lösung durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und der Tyrosingehalt der Lösung nach M. T. HANKE und K. K. KOESSLER<sup>9</sup> bestimmt.

O. FÜRTH<sup>10</sup> hat die Reaktionen mit Diazobenzolsulfosäure und mit Brom, ferner das Verfahren von O. FOLIN und M. LOONEY<sup>11</sup> einer Nachprüfung unterzogen und gefunden, daß sie zwar bei reinen Lösungen brauchbare Ergebnisse liefern mögen, aber nicht zur Bestimmung des Tyrosins in Proteinhydrolysaten geeignet sind.

<sup>1</sup> F. LIPPICH: Zeitschr. physiol. Chem. 1914, **90**, 124.

<sup>2</sup> F. EHRLICH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1904, **37**, 1821. — P. A. LEVENE u. D. D. VAN SLYKE: Journ. Biol. Chem. 1909, **6**, 391; C. 1909, **II**, 1754.

<sup>3</sup> H. PAULY: Zeitschr. physiol. Chem. 1904, **42**, 508; 1915, **94**, 284. — Vgl. auch E. GEBAUER-FÜLLNEGG: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **191**, 222.

<sup>4</sup> K. INOUE: Zeitschr. physiol. Chem. 1913, **83**, 79.

<sup>5</sup> G. DENIGÈS: Compt. rend. Paris 1900, **130**, 583; C. 1900, **I**, 735.

<sup>6</sup> C. TH. MÖRNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1902, **37**, 86.

<sup>7</sup> O. FOLIN u. V. CIOCALTEU: Journ. Biol. Chem. 1927, **73**, 627; C. 1927, **II**, 2089.

<sup>8</sup> M. T. HANKE: Journ. Biol. Chem. 1925, **66**, 475 u. 1928, **79**, 587; C. 1926, **I**, 2612; 1929, **I**, 115.

<sup>9</sup> M. T. HANKE u. K. K. KOESSLER: Journ. Biol. Chem. 1922, **50**, 235, 271; C. 1922, **II**, 609.

<sup>10</sup> O. FÜRTH: Biochem. Zeitschr. 1924, **146**, 259.

<sup>11</sup> O. FOLIN u. M. LOONEY: Journ. Biol. Chem. 1922, **51**, 421; C. 1922, **IV**, 849.

h) l-Serin ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxypropionsäure,  $\alpha$ -Amino-äthylen-milchsäure),  $C_3H_7NO_3 = CH_2(OH) \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist löslich in etwa 3 Tln. Wasser.

i) Cystein ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -thiomilchsäure),  $C_3H_7NSO_2 = CH_2(SH) \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist leicht löslich in Wasser, Essigsäure, Mineralsäuren und Ammoniak. Es geht durch Oxydationsmittel leicht in Cystin über (in wäßriger und alkalischer Lösung schon durch den Luftsauerstoff) und wird aus letzterem durch Reduktionsmittel (Zinn und Salzsäure) zurückgebildet.

**Nachweis.** Kochen mit alkalischer Bleilösung führt zur Abscheidung von Schwefelblei.

Mit Eisenchlorid wird eine neutrale Cysteinlösung vorübergehend indigoblau gefärbt (BAUMANN<sup>1</sup> und MÖRNER<sup>2</sup>); in alkalischer Lösung tritt mit Eisenchlorid Violettfärbung ein (L. J. HARRIS<sup>3</sup>). — 1 ccm Cysteinhydrochloridlösung, mit 0,5 ccm 0,2%iger Dimethyl-p-phenyldiaminhydrochloridlösung gemischt und mit 1 Tropfen 5%iger Eisenchloridlösung versetzt, gibt eine beständige tiefblaue Färbung; Empfindlichkeit 0,05 mg Cysteinhydrochlorid. Cystin, lösliche Sulfide und Thiomilchsäure geben die Reaktion nicht (R. FLEMING<sup>4</sup>).

Mit Natriumnitroprussid. Versetzt man eine Cysteinlösung mit einigen Tropfen 4%iger Natriumnitroprussidlösung und einigen Tropfen Ammoniak, so färbt sie sich stark purpurrot bis -violett. Die Cystein-Kupferverbindung gibt mit Natriumnitroprussid einen rotbraunen Niederschlag (V. ARNOLD<sup>5</sup>).

Naphthochinon und Benzochinon<sup>6</sup> sowie Naphthochinonsulfosaures Natrium<sup>7</sup> geben mit Cystein Rotfärbungen, letzteres zum Unterschiede von Cystin.

**Bestimmung.**  $\alpha$ ) Nach Y. OKUDA<sup>8</sup> wird die Substanz, 5—50 mg Cystein enthaltend, in 20 ccm genau 2%iger Salzsäure gelöst, mit 5 ccm 5%iger Kaliumjodidlösung und 5 ccm genau 4%iger Salzsäure versetzt, mit  $\frac{1}{300}$  N.-Kaliumjodatlösung (a ccm) auf schwaches Gelb titriert und sofort die Temperatur abgelesen. Da das Titrationsergebnis mit den Versuchsbedingungen, insbesondere auch der Temperatur, schwankt, muß der Cysteingehalt mit einem empirischen Faktor berechnet werden, den man dadurch ermittelt, daß man 20 ccm einer 2%igen Salzsäure, welche 0,01 g Cystein enthält, in gleicher Weise wie die Versuchslösung behandelt. Man zeichnet sich daher zweckmäßig eine Kurve für verschiedene Temperaturen.

Bei 17,5° beträgt z. B. der Cysteingehalt in 20 ccm  $\frac{0,01 \cdot a}{4,65}$  g.

$\beta$ ) E. ABDERHALDEN und E. WERTHEIMER<sup>9</sup> verwenden die oben angegebene Reaktion mit Natriumnitroprussid zu einer colorimetrischen Bestimmung des Cysteins, wobei sie die entstehende Rotviolett-färbung mit einer eingestellten Farbblösung von Bordeauxrot und Methylenblau vergleichen.

k) l-Cystin ( $\alpha$ -Diamino- $\beta$ -dithiomilchsäure = Disulfid des Cysteins),  $C_6H_{12}N_2S_2O_4 = HOOC \cdot CH(NH_2) \cdot CH_2 \cdot S - S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ , ist sehr schwer löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther, löslich in starken Säuren und leicht löslich in Alkalien, aber unlöslich in Ammoniumcarbonat. — Cystin wird durch Zinn und Salzsäure zu Cystein reduziert und dieses durch Oxydation leicht in Cystin übergeführt.

**Nachweis.** Cystin wird durch Phosphorwolframsäure zu 97% gefällt, ferner durch Mercurisulfat und aus schwefelsaurer Lösung auch durch Mercuriacetat. — Beim Erwärmen mit alkalischer Bleilösung tritt mit Cystin in gleicher Weise wie mit Cystein Abscheidung von Schwefelblei ein. — Cystin ist auch durch die Farbreaktion mit Naphthochinon nachweisbar (G. HUNTER und B. A. EAGLES<sup>10</sup>).

<sup>1</sup> BAUMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1884, 8, 303.

<sup>2</sup> MÖRNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1899, 28, 595.

<sup>3</sup> L. J. HARRIS: Biochem. Journ. 1922, 16, 739; C. 1923, III, 546.

<sup>4</sup> R. FLEMING: Biochem. Journ. 1930, 24, 965; C. 1931, I, 653.

<sup>5</sup> V. ARNOLD: Anz. Akad. Wiss. Krakau A 1910, 56; C. 1910, I, 1888 und Zeitschr. physiol. Chem. 1911, 70, 314.

<sup>6</sup> E. DYER u. O. BAUDISCH: Journ. Biol. Chem. 1932, 95, 483; 1933, 99, 485; C. 1932, I, 3326; 1933, I, 2586.

<sup>7</sup> M. X. SULLIVAN: Publ. Health. Rep. 1926, 41, 1030; 1929, 44, 1421; C. 1929, II, 3041.

<sup>8</sup> Y. OKUDA: Journ. Biochem. 1925, 5, 201; C. 1926, I, 1462.

<sup>9</sup> E. ABDERHALDEN u. E. WERTHEIMER: Pflügers Arch. 1923, 198, 122; C. 1923, III, 463.

<sup>10</sup> G. HUNTER u. B. A. EAGLES: Journ. Biol. Chem. 1927, 72, 167; C. 1927, II, 107.

**Bestimmung.**  $\alpha$ ) Nach Y. OKUDA<sup>1</sup>. Die salzsaure Cystinlösung bzw. das mit Tierkohle entfärbte salzsaure Hydrolysat<sup>2</sup> von 1–5 g Protein wird mit wenig Zinkstaub versetzt und unter häufigem Umschütteln 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann nach dem Filtrieren auf 100 ccm aufgefüllt. In 1 ccm der Lösung wird die freie Salzsäure titrimetrisch bestimmt und dementsprechend die Gesamtlösung mit Natronlauge (20%) bzw. Salzsäure genau auf 2% freie Salzsäure gebracht. 20 ccm dieser Lösung werden mit 5 ccm 5%iger Kaliumjodidlösung und 5 ccm genau 4%iger Salzsäure versetzt und mit  $\frac{1}{300}$  N.-Kaliumjodatlösung ( $a$  ccm) auf schwaches Gelb titriert und sofort die Temperatur abgelesen. Da das Titrationsergebnis mit den Versuchsbedingungen, insbesondere auch der Temperatur, schwankt, muß der Cystingehalt mit einem empirischen Faktor berechnet werden, den man dadurch ermittelt, daß man 1,01 g Cystin in 50 ccm etwa 5%iger Salzsäure löst, mit wenigen Dezigramm Zinkstaub wie oben reduziert und nach dem Filtrieren auf 100 ccm auffüllt. 1 ccm dieser Lösung wird mit 19 ccm genau 2%iger Salzsäure gemischt und dann werden diese 20 ccm genau wie die 20 ccm Versuchslösung weiter behandelt. Man zeichnet sich daher zweckmäßig auch eine Kurve für verschiedene Temperaturen.

Bei 17,5° beträgt z. B. der Cystingehalt in 20 ccm  $\frac{0,0101 \cdot a}{4,65}$  g.

Man bestimmt auf diese Weise das in der Lösung bzw. im Hydrolysat etwa vorhandene Cystein mit. Um zu prüfen, ob Cystein vorhanden ist, setzt man wenige Kubikzentimeter Kaliumjodid- und 1 Tropfen Kaliumjodatlösung hinzu; bei Abwesenheit von Cystein färbt sich die Lösung gelb; im anderen Falle bleibt sie farblos. Ist dies der Fall, so kann man nach obigem Verfahren zunächst Cystein + Cystin bestimmen und dann nach dem bei Cystein angegebenen Verfahren das Cystein allein; die Differenz beider Bestimmungen ergibt das Cystin.

$\beta$ ) Oxydation zu Cysteinsäure. Cystin wird durch Brom zu Cysteinsäure [ $\text{CH}_2 \cdot (\text{SO}_3\text{H}) \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ ]<sup>3</sup> oxydiert: die saure Lösung wird bei Gegenwart von Natriumbromid mit 0,05 N.-Kaliumbromatlösung auf Gelb titriert. Da 1 Mol Cystin 10 Atome Brom verbraucht, entspricht 1 ccm Bromatlösung 7,21 mg Cystin<sup>4</sup>.

$\gamma$ ) O. FOLIN und A. D. MARENZI<sup>5</sup> geben ein colorimetrisches Verfahren mit Harnsäure, Lithiumsulfat und Natriumsulfat an.

## 2. Monoamino-dicarbonensäuren und ihre Säureamide.

a) **Asparaginsäure** (Amino-bernsteinsäure),  $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4 = \text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ , ist löslich in 256 Tln. Wasser (10°) und 18,6 Tln. siedendem Wasser, unlöslich in Alkohol. Kupfer- und Bleisalz, letzteres durch Kochen mit Bleioxyd darstellbar, sind schwer löslich; Silbersalz (Schmp. 216–217°) und Calciumsalz werden aus wäßriger Lösung durch Alkohol gefällt; Mercurisalz wird durch Mercuriacetat gefällt.

**Nachweis.** Asparaginsäure wird durch Salpetrige Säure in Äpfelsäure übergeführt (S. 619); Nachweis der Äpfelsäure S. 1105. — Nach W. SUIDA<sup>6</sup> bilden Asparaginsäure und Glutaminsäure als Hydrochloride — nicht die freien Säuren — mit den meisten basischen Farbstoffen, wie Krystallviolett, Nilblau und Safranin, Niederschläge. Das Bariumsalz der Asparagin-carbonsäure (S. 624) ist schwer löslich. — Die Benzoylverbindung, aus Wasser krystallisiert, schmilzt bei 184–185° (korr.)

b) **Glutaminsäure** ( $\alpha$ -Amino-glutarsäure),  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 = \text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ , ist löslich in 100 Tln. Wasser (16°) und unlöslich in Alkohol und Äther. Beim Erhitzen auf 150° entsteht Pyrrolidoncarbonsäure (Schmp. 162°, aus Wasser). Kupfer- und Zinksalz sind schwer löslich; Mercurisalz wird durch Mercuriacetat gefällt.

**Nachweis.** Leitet man in eine wäßrige Glutaminsäurelösung Salzsäuregas im Überschuß ein, so scheidet sich das Hydrochlorid (Schmp. 202°) aus; gleichzeitig vorhandene Asparagin-

<sup>1</sup> Y. OKUDA: Journ. Biochem. 1925, 5, 217; C. 1926, I, 1462.

<sup>2</sup> Enthält die Lösung mehr als 6 g freie Salzsäure, so wird der Überschuß im Vakuum abdestilliert.

<sup>3</sup> E. FRIEDMANN: Beitr. chem. Physiol. u. Path. 1902, 3, 1; C. 1902, II, 1360.

<sup>4</sup> S. L. JODDI: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, 48, 751. — H. MEYER: Nachweis und Bestimmung chemischer Verbindungen. S. 200. Berlin: Julius Springer 1933.

<sup>5</sup> O. FOLIN u. A. D. MARENZI: Journ. Biol. Chem. 1929, 83, 103; C. 1929, II, 2082.

<sup>6</sup> W. SUIDA: Zeitschr. physiol. Chem. 1907, 50, 174.

säure wird nicht ausgeschieden. — Neben Pyrrolidoncarbonsäure wird Glutaminsäure durch die Ninhydrinreaktion (S. 615) nachgewiesen.

### Säureamide der Asparagin- und Glutaminsäure.

Die Säureamide scheiden beim Kochen mit Säure oder Lauge das an die Carboxylgruppe gebundene  $\text{NH}_2$  als Ammoniak ab, das mit Magnesiumoxyd abdestilliert und bestimmt werden kann.

Die  $\text{NH}_2$ -Gruppe innerhalb des Radikals der dabei gebildeten Aminosäure kann dann nach dem Nitritverfahren (S. 619) bestimmt werden.

**Asparagin** (Asparaginsäure-amid),  $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 = (\text{NH}_2)\text{OC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ , Schmp. 226—227°, ist löslich in 55,8 Tln. Wasser (10,5°) und 1,9 Tln. siedendem Wasser, unlöslich in Alkohol. — Asparagin ist fällbar durch Kupferacetat und Mercurinitrat.

**Nachweis.** Die für den Nachweis von Asparagin angegebene Pyrrolreaktion (Rotfärbung eines mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspanes durch die beim Erhitzen von Asparagin entstehende Pyrroldämpfe) gibt nach C. NEUBERG<sup>1</sup> eine Reihe von Aminosäuren usw. und ist daher nicht spezifisch.

**Glutamin** (Glutaminsäure-amid),  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3 = (\text{NH}_2)\text{OC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ , ist löslich in 25 Tln. Wasser (16°), unlöslich in Alkohol. Die Kupferverbindung ist schwer löslich; Mercurinitrat gibt eine Fällung.

### 3. Diamino-monocarbonsäuren.

Die Diaminosäuren haben infolge der zweiten Aminogruppe im Radikal einen stärker basischen Charakter als die Monoaminosäuren; ihre wäßrigen Lösungen reagieren daher alkalisch.

Aus verdünnten Lösungen werden sie durch Phosphorwolframsäure gefällt und können dadurch von den Monoaminosäuren getrennt werden; bei den Monoaminosäuren Glykokoll und Alanin muß die Konzentration aber weniger als 2% betragen.

**a) Arginin** ( $\delta$ -Guanidin- $\alpha$ -amino-valeriansäure),  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 = \text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}(\text{NH}) \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ , Schmp. 238°, ist leicht löslich in Wasser und sehr schwer löslich in Alkohol; zieht Kohlensäure aus der Luft an. Arginin ist fällbar durch NESSLERS Reagens, ferner durch Silbernitrat und Mercurinitrat mit Barytwasser. Schwer löslich sind Pikrat, Pikrolonat und das Arginin-Kupferniträt (Schmp. 232—234°).

**Nachweis.**  $\alpha$ ) Mit  $\alpha$ -Naphthol nach S. SAKAGUCHI<sup>2</sup>. Gibt man zu 3 ccm einer alkalischen Argininlösung 2 Tropfen  $\alpha$ -Naphthollösung (0,1 g in 100 ccm Natronlauge [5%]) und darauf wenige Tropfen 0,1 N.-Natriumhypochloritlösung, so tritt nach kurzer Zeit Rotfärbung ein. Empfindlichkeit 1:100000.

$\beta$ ) Mit Diacetyl nach A. HARDEN und D. NORRIS<sup>3</sup>. 1 ccm einer etwa 0,25%igen Argininlösung wird mit 0,5 ccm N.-Kalilauge gemischt, mit Wasser auf 5 ccm verdünnt und dann werden 0,05 ccm 1%ige Diacetylösung hinzugegeben. Es tritt eine violettrote Färbung ein. Ein Überschuß von Alkali und Diacetyl ist zu vermeiden. Die Reaktion ist eine solche des Guanidinkomplexes und eine allgemeine Reaktion auf Proteine.

$\gamma$ ) Mit Flaviansäure siehe unter Bestimmung  $\gamma$ ).

**Bestimmung.**  $\alpha$ ) Verfahren von B. C. P. JANSEN<sup>4</sup>. Das Verfahren beruht auf der Spaltung des Arginins durch Arginase in Ornithin und Harnstoff und der Bestimmung des letzteren. Nach A. BONOT und TH. CAHN<sup>5</sup> verfährt man, wie folgt: Die Argininlösung

<sup>1</sup> C. NEUBERG: SALKOWSKI-Festschrift 1904, 271; C. 1904, II, 1435.

<sup>2</sup> S. SAKAGUCHI: Journ. Biochem. 1925, 5, 25; C. 1925, II, 1547.

<sup>3</sup> A. HARDEN u. D. NORRIS: Journ. Physiol. 1911, 42, 332; C. 1911, II, 393. — K. LANG: Zeitschr. physiol. Chem. 1932, 208, 273.

<sup>4</sup> B. C. P. JANSEN: Chem. Weekbl. 1917, 14, 125; C. 1917, I, 913.

<sup>5</sup> A. BONOT u. TH. CAHN: Compt. rend. Paris 1927, 184, 246; C. 1927, I, 2456.

bzw. das Proteinhydrolysat wird mit Natriumcarbonat auf  $p_H = 9,9$  gebracht. Nach 72stündiger Einwirkung der Arginase<sup>1</sup> bei 37° wird mit Essigsäure neutralisiert, filtriert, unterhalb 70° eingengt, mit 70%iger Essigsäure aufgenommen und der Harnstoff mit überschüssiger 10%iger Xanthhydrollösung in Methylalkohol gefällt. Nach 10 Stunden wird der Niederschlag abfiltriert, mit wenig mit Xanthylharnstoff gesättigtem Methylalkohol nachgewaschen und bei 100° getrocknet. Xanthhydrollösung  $\times 0,414 =$  Alanin.

$\beta$ ) Colorimetrische Bestimmung mit  $\beta$ -Naphthol. C. J. WEBER<sup>2</sup> hat das Verfahren von S. SAKAGUCHI zum Nachweise von Arginin zu einem solchen zu seiner Bestimmung ausgearbeitet: 5 ccm der zu prüfenden Lösung werden, in einem Reagensglase in Eiswasser gehängt, mit je 1 ccm Natronlauge (10%) und  $\alpha$ -Naphthollösung (0,02% = 20 ccm 0,1%ige Lösung in 95%igem Alkohol mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt) versetzt und 3 Minuten abgekühlt. Dann werden 0,1—0,2 ccm Natriumhypobromitlösung (2 g Brom in 100 ccm 5%iger Natronlauge) zugegeben, rasch geschüttelt und nach 4—6 Sekunden 1 ccm Harnstofflösung (40%) zugesetzt. Nach kurzem gründlichem Mischen stellt man das Reagensglas wieder in Eiswasser. Nach 5 Minuten wird die bei Gegenwart von Arginin entstandene Rotfärbung mit in derselben Weise bereiteten Argininvergleichslösungen mit 0,005—0,05 mg Arginin in 5 ccm verglichen. Die zur vollen Farbentwicklung erforderliche Menge Hypobromitlösung ist in einem Vorversuch mit um je 0,1 ccm steigenden Mengen festzustellen.

$\gamma$ ) Verfahren zur Trennung und Bestimmung von Arginin und Histidin nebeneinander.

$\alpha\alpha$ ) Mittels der Silbersalze. Nach diesem Verfahren von A. KOSSEL<sup>3</sup> werden die Silbersalze der beiden Aminosäuren in der Nähe des isoelektrischen Punktes der freien Aminosäuren,  $p_H = 6,8—7,2$  bei Histidin und  $p_H = 10—11$  bei Arginin, gefällt. Nach H. B. VICKERY und C. S. LEAVENWORTH<sup>4</sup> verfährt man, wie folgt: Die schwach schwefelsaure Lösung wird mit heißgesättigter Silbersulfatlösung im Überschuß versetzt und mit kaltgesättigtem Barytwasser bis auf  $p_H = 6,8—7,2$  (Bromthymolblau-Umschlag) gebracht, wobei Histidinsilber ausfällt, das in heißem Wasser mit wenig Salzsäure gelöst wird; darauf wird die Fällung des Histidinsilbers in gleicher Weise wiederholt. Zur Bestimmung des Arginins werden die vereinigten Filtrate im Vakuum auf etwa das 1 $\frac{1}{2}$ fache des Ausgangsvolumens eingengt und dann die Lösung mit warmgesättigtem Barytwasser auf  $p_H = 10$  bis 11 gebracht; hierbei fällt Argininsilber aus. Die Aminosäuren können nach der Zersetzung der Silbersalze mit Salzsäure als Flavianate identifiziert und ihre Menge kann durch eine Stickstoffbestimmung in den Silbersalzen bestimmt werden.

$\beta\beta$ ) Mittels der Flavianate<sup>5</sup>. Das Verfahren beruht auf der verschiedenen Löslichkeit von Arginin-, Histidin- und Lysinflavianat; Wasser von 19° löst 0,0177% Arginin-, 0,146% Histidin- und 1,862% Lysinflavianat.

Nach A. KOSSEL u. W. STAUDT<sup>6</sup> verfährt man, wie folgt: Arginin und Histidin werden mit Hilfe des Silberbarytverfahrens (s. oben) zusammen gefällt — also bei  $p_H = 10—11$  — und in dem Niederschlag der Stickstoff nach KJELDAHL bestimmt. Einen zweiten Niederschlag zersetzt man mit Schwefelwasserstoff und fällt in der Lösung (10 ccm) durch Zusatz von 0,5 g Flaviansäure, in 10 ccm Wasser gelöst, das Argininflavianat. Nach 3tägigem Stehen wird der Niederschlag durch einen GOOCH-Tiegel abgesaugt, mit 5—10 ccm Wasser, dem eine Spur Flaviansäure zugesetzt ist, gewaschen und bei 105° getrocknet. Der Fällung ist innerhalb der Acidität bis 0,1 N.-Schwefelsäure vollständig. Der Histidingehalt darf wegen der geringen Löslichkeit seines Flavianats (0,146%) nicht zu groß sein. Die Löslichkeit des Argininsilbers in der konz. Barytlauge = 36 mg/l ist zu berücksichtigen.

Der Histidingehalt wird aus der Differenz berechnet.

<sup>1</sup> Über die Darstellung der Arginase siehe A. HUNTER u. J. A. DAUPHINEE: Journ. Biol. Chem. 1930, 85, 627; C. 1930, I, 1834.

<sup>2</sup> C. J. WEBER: Journ. Biol. Chem. 1930, 86, 217; C. 1930, I, 3705. — Vgl. auch G. KLEIN u. K. TAUBÖCK: Biochem. Zeitschr. 1932, 251, 10, sowie E. JORPES u. S. THORÉN: Biochem. Journ. 1932, 26, 1504; C. 1933, I, 820.

<sup>3</sup> A. KOSSEL u. F. KUTSCHER: Zeitschr. physiol. Chem. 1900, 31, 171. — A. KOSSEL u. S. EDLBACHER: Zeitschr. physiol. Chem. 1920, 110, 241.

<sup>4</sup> H. B. VICKERY u. C. S. LEAVENWORTH: Journ. Biol. Chem. 1926, 68, 225; 1927, 72, 403; 75, 115; C. 1926, II, 922; 1927, I, 3022; 1928, I, 800.

<sup>5</sup> Der Name „Flaviansäure“ für die 1-Naphthol-2,4-dinitro-7-sulfosäure, die Säure des Farbstoffes Naphtholgelb S der I. G. Farbenindustrie, rührt von A. KOSSEL und R. E. GROSS (Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 135, 167) her.

<sup>6</sup> A. KOSSEL u. W. STAUDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 156, 270. — A. KOSSEL u. R. E. GROSS: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 135, 167. — A. KOSSEL u. F. CURTIUS: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 148, 283.





Trockne und behandelt mit Ammoniakdampf, so tritt die lebhaft rote WEIDELSCHE Reaktion ein, die bei Zusatz von wenig Natronlauge in Rotviolett übergeht.

δ) Zum Nachweise und zur Trennung von Histidin neben Arginin und Lysin hat A. KOSSEL<sup>1</sup> ein Verfahren beschrieben, das auf der Fällung von Histidincarbonat durch Mercurichlorid beruht, während Arginin- und Lysincarbonat unter den gleichen Verhältnissen nicht gefällt werden.

**Bestimmung.** Hierfür kommt fast ausschließlich die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure (PAULYSche Reaktion) in Frage.

α) Nach M. WEISS und N. SSOBOLEW<sup>2</sup> verfährt man, wie folgt: 10 ccm der Histidinlösung werden mit 1,5 ccm Diazoreagens [frisch bereitet durch Mischen von 1 Tl. Sulfanilsäurelösung (4 g Sulfanilsäure, 40 ccm konz. Salzsäure, 400 ccm Wasser) und 2 Tln. wäßriger 0,5%iger Natriumnitritlösung] gemischt und darauf mit 3 ccm 10%iger Natriumcarbonatlösung (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Die zu untersuchende Histidinlösung wird nach und nach so lange verdünnt, bis die letzte Verdünnung die gleiche Rotfärbung gibt wie die unter den gleichen Bedingungen ausgeführte Bestimmung bei einer 0,01%igen Histidin-Vergleichslösung.

Bei zu hohen Histidengehalten tritt die Reaktion nicht ein, da Histidin selbst die Reaktion stört; ebenso finden sich störende Stoffe im Harn, die durch einen größeren, durch Versuche zu ermittelnden Zusatz von Diazoreagens unschädlich gemacht werden müssen.

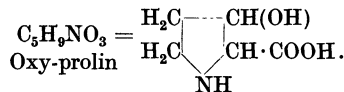
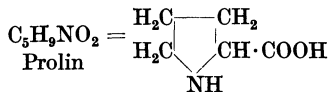
K. K. KOESSLER und M. T. HANKE<sup>3</sup> führen die Bestimmung in ähnlicher Weise aus, halten es aber für wesentlich, daß zunächst das Diazoreagens mit der Natriumcarbonatlösung vermischt und dann erst die Histidinlösung hinzugegeben wird. Als Vergleichslösung dient eine Mischung von Kongorot und Methyloorange. E. JORPES<sup>4</sup> hält diese Ausführung für ungenau und empfiehlt ein abgeändertes Verfahren.

β) Das von C. L. LAUTENSCHLÄGER<sup>5</sup> vorgeschlagene titrimetrische Verfahren mit dem Diazoreagens reagiert auch auf andere Aminosäuren, insbesondere auf Tyrosin.

γ) Über die Trennung und Bestimmung von Histidin und Arginin siehe S. 631.

**b) Prolin und Oxy-prolin.** Prolin (α-Pyrrolidin-carbonsäure) ist leicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol, unlöslich in Äther.

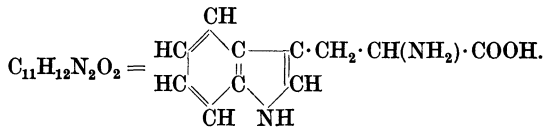
Oxy-prolin (Oxy-α-pyrrolidin-carbonsäure) ist leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol.



Zum Nachweis von Prolin werden das Kupfersalz und das Chloraurat (R. WILLSTÄTTER und FR. ETTLINGER<sup>6</sup>, E. FISCHER und G. REIF<sup>7</sup>), das Pikrat (D. ALEXANDROFF<sup>8</sup>) und das Phenylisocyanat (E. FISCHER<sup>9</sup>) und zum Nachweis von Oxy-prolin die β-Naphthalinsulfoverbindung (L. ROSENTHALER<sup>10</sup>) angegeben.

**e) Tryptophan** (β-Indol-α-amino-propionsäure), ist schwer in kaltem, leicht in warmem Wasser löslich und reagiert gegen Lackmus sauer<sup>11</sup>.

Schwer löslich sind das Kupfersalz, das Pikrat und Pikrolonat; durch Mercurisulfat fällbar. — Eine konz. Tryptophanlösung gibt mit



einem in Salzsäure getauchten Fichtenspan Rotfärbung (Pyrrolreaktion).

<sup>1</sup> A. KOSSEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1898, 25, 165.

<sup>2</sup> M. WEISS u. N. SSOBOLEW: Biochem. Zeitschr. 1914, 58, 119.

<sup>3</sup> K. K. KOESSLER u. M. T. HANKE: Journ. Biol. Chem. 1919, 39, 497; C. 1920, IV, 552.

<sup>4</sup> E. JORPES: Biochem. Journ. 1932, 26, 1507; C. 1933, I, 820.

<sup>5</sup> C. L. LAUTENSCHLÄGER: Zeitschr. physiol. Chem. 1913, 102, 226.

<sup>6</sup> R. WILLSTÄTTER u. FR. ETTLINGER: Liebigs Ann. 1903, 326, 842; C. 1903, I, 842.

<sup>7</sup> E. FISCHER u. G. REIF: Liebigs Ann. 1908, 363, 118; C. 1908, II, 1729.

<sup>8</sup> D. ALEXANDROFF: Zeitschr. physiol. Chem. 1905, 46, 17.

<sup>9</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1901, 34, 454.

<sup>10</sup> L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen, S. 632. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

<sup>11</sup> Tryptophanlösungen scheiden daher nach P. DANILA (Compt. rend. Soc. de biol. 1923, 88, 278; C. 1923, IV, 565) aus Jodsäurelösung beim Kochen Jod ab.

**Nachweis.**  $\alpha$ ) Auf der Gegenwart von Tryptophan beruhen die Proteinreaktionen von ADAMKIEWICZ (S. 605), LIEBERMANN (S. 605), EDLBACHER (S. 606) und die mit den aromatischen Aldehyden von NEUBAUER (S. 605).

$\beta$ ) Reaktion mit Chlor- und Brom („Tryptophanreaktion“)<sup>1</sup>. Setzt man zu einer neutralen Tryptophanlösung Chlor- oder Bromwasser hinzu, so bildet sich je nach der Konzentration der Lösung eine rotviolette Färbung oder ein solcher Niederschlag (Monohalogen-Tryptophan =  $C_{11}H_{11}N_2O_2 \cdot \text{Halogen}$ ), die bei weiterem Halogenwasserzusatz in Gelb übergehen (Trihalogen-Tryptophan =  $C_{11}H_9N_2O_2$  oder  $C_{11}H_9N_2O_2 \cdot [\text{Halogen}]_3$ ); da 2 Halogenatome leicht abspaltbar sind, wird durch Zusatz von Tryptophanlösung die rote Verbindung zurückgebildet. Die rote Verbindung ist in Chloroform und Äther mit rotvioletter, in Äthylacetat mit himbeerroter Farbe löslich.

Die stärkste Rotfärbung (bzw. Niederschlag) tritt bei 4 Atomen Halogen auf 1 Mol Tryptophan ein. Die Reaktion tritt auch in alkalischer Lösung sowie in essigsaurer und schwefelsaurer Lösung ein, während Halogenwasserstoffsäuren den Eintritt der Reaktion verhindern.

$\gamma$ ) Reaktion mit Formaldehyd und Nitrit nach E. VOISENET<sup>2</sup>. Man gibt zu 2–3 ccm der zu untersuchenden Lösung in einem Reagensglase 1 Tropfen 5%iger Formaldehydlösung (40%) und verdünnt mit dem dreifachen Volumen nitrithaltiger Salzsäure (auf 1 l Salzsäure [1,18] 0,5 ccm 3,6%ige Kaliumnitritlösung). Nach dem Mischen tritt sofort Rosafärbung ein, die in etwa 5 Minuten in ein starkes Violettblau übergeht. Erhitzen auf etwa 50° begünstigt die Reaktion; sie wird aber durch einen Überschuß von Nitrit und Formaldehyd verhindert (Indolreaktion). Empfindlichkeit 0,1 mg.

$\delta$ ) Reaktion mit aromatischen Aldehyden (S. 605). Nach E. HERZFELD<sup>3</sup> führt man die Reaktion bei Tryptophanlösungen am besten mit Salzsäure, wie folgt, aus: Man setzt zu 5 ccm der zu untersuchenden Lösung 1 ccm Aldehydreagens (2 g p-Dimethyl-amino-benzaldehyd + 50 ccm konz. Salzsäure + 50 ccm Wasser) und bis zu 10 ccm konz. Salzsäure und läßt dann 30 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Bei Gegenwart von Tryptophan tritt über Rot und Rotviolett eine beständige Blaufärbung ein. Empfindlichkeit 0,005 mg.

$\epsilon$ ) Reaktion mit Formaldehyd und p-Dimethyl-amino-benzaldehyd nach E. KOMM<sup>4</sup>. Beide Reaktionen sind in der Ausführung ähnlich, beide sind stark abhängig von der Konzentration der Reagenzien, insbesondere des Formaldehyds. Der Farbton schwankt bei der Formaldehydreaktion zwischen Rot- und Blauviolett, ist dagegen bei dem Benzaldehyd einheitlich blau; letztere Reaktion ist aber weniger empfindlich. Bei beiden Reaktionen wird bei Tryptophanlösungen<sup>5</sup> das Farbmaximum schneller erreicht, wenn man geringe Mengen oxydierender Mittel wie Nitrit (s. die Reaktion  $\gamma$ ) oder Wasserstoffsuperoxid oder Prolin oder Gelatine zusetzt. — Reaktion mit Formaldehyd: 2 ccm der zu untersuchenden wäßrigen Tryptophanlösung werden mit 2 ccm 10%iger Salzsäure versetzt, welche soviel Formaldehyd enthält, daß das zu bereitende gesamte Reaktionsgemisch etwa 0,375 mg-% Formaldehyd enthält (z. B. in 100 ccm Salzsäure 1,2 ccm 0,1%ige Formaldehydlösung), ferner mit 1 ccm 5%iger Gelatinelösung in 10%iger Salzsäure, weiterhin 5 ccm 10%ige Salzsäure. Dann unterschichtet man mit 10 ccm konz. Schwefelsäure (96%) und verteilt diese durch vorsichtiges Schütteln in der Gesamtflüssigkeit. Bei Gegenwart von Tryptophan oder solches enthaltenden Proteinen tritt eine rot- bis blauviolette Färbung ein. — Die Reaktion mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd wird in gleicher Weise ausgeführt, nur wendet man statt der Formaldehydlösung eine 0,25%ige Lösung des Benzaldehydes in 10%iger Salzsäure an. Bei Gegenwart von Tryptophan tritt eine reine Blaufärbung ein; nur bei zuviel Säure wird die Farbe grün.

**Bestimmung.**  $\alpha$ ) Verfahren mit Formaldehyd und Schwefelsäure nach J. TILLMANS und A. ALT<sup>6</sup>. 0,5–10 ccm Tryptophan- oder Proteinlösung<sup>7</sup> werden in einem Becherglase mit 1 Tropfen 2%iger Formaldehydlösung (40%) und im Überschuße mit 66%iger Schwefelsäure versetzt, umgeschüttelt — so daß abgeschiedene Proteine wieder

<sup>1</sup> Biochem. Zeitschr. 1907, 2, 357. — C. NEUBERG: 1907, 6, 275; 1910, 24, 441.

<sup>2</sup> E. VOISENET: Bull. Soc. chim. Paris 1905, (3) 33, 1198; C. 1906, I, 90. — Vgl. auch O. FÜRTH u. E. NOBEL: Biochem. Zeitschr. 1920, 109, 103; und O. FÜRTH u. F. LIEBEN: Biochem. Zeitschr. 1920, 109, 124.

<sup>3</sup> E. HERZFELD: Biochem. Zeitschr. 1913, 54, 258.

<sup>4</sup> E. KOMM u. E. BÖHRINGER: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 124, 287. — E. KOMM: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 140, 74; 1926, 156, 35, 161, 202.

<sup>5</sup> Bei Proteinlösungen oder -aufschwemmungen tritt die Reaktion auch ohne Zusatz von oxydierenden Mitteln sowie von Prolin und Gelatine ebenso schnell auf wie bei reinen Tryptophanlösungen mit diesen Zusätzen.

<sup>6</sup> J. TILLMANS u. A. ALT: Biochem. Zeitschr. 1925, 164, 125.

<sup>7</sup> Das Lösungsmittel kann Wasser, Salzlösung, Alkohol oder verdünnte — nicht über 5%ige — Natronlauge sein.

vollständig in Lösung gehen — und in einem HEHNER-Zylinder (mit Ablaufhahn) mit Schwefelsäure auf 100 ccm aufgefüllt. Man schüttet die Lösung noch ein- oder zweimal in das Becherglas zurück und läßt dann die Lösung im HEHNER-Zylinder 10 Minuten stehen. Darauf vergleicht man die bei Gegenwart von Tryptophan weingelbe Färbung mit der einer in gleicher Weise hergestellten, etwa 0,4—1,0 mg reines Tryptophan in 50%igem Alkohol enthaltenden Standardlösung, die höchstens 30—40% stärker sein soll als die zu prüfende Lösung. Die Schwankungen mehrerer Bestimmungen betragen höchstens 10%.

β) Verfahren mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd nach E. KOMM<sup>1</sup>. Von den beiden Verfahren zum Nachweis des Tryptophans desselben Autors (s. oben) ist das mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd für die colorimetrische Bestimmung vorzuziehen, da die dabei erzielten Farben ein einheitliches Blau sind. Die Ausführung der Bestimmung erfolgt in gleicher Weise, wie oben angegeben, und man verwendet dabei eine Vergleichslösung von freiem Tryptophan, der 1 ccm 5%ige Gelatinelösung zugesetzt ist. Man erreicht bei der Versuchs- und Vergleichslösung die höchste nur allein verwendbare Farbstärke nach 15 bis 20 Minuten.

γ) Sonstige Verfahren. Von den sonstigen Verfahren liefern nach J. TILLMANS und A. ALT<sup>2</sup> die von SANDERS und MAY<sup>3</sup>, von O. FOLIN und M. LOONEY<sup>4</sup> sowie von C. E. MAY und E. R. ROSE<sup>5</sup> zwar brauchbare Ergebnisse; sie sind aber in der Ausführung sehr umständlich; dagegen liefern die Verfahren von P. A. LEVENE und C. A. ROUILLER<sup>6</sup>, H. FASAL<sup>7</sup>, A. HOMER<sup>8</sup>, E. HERZFELD<sup>9</sup>, O. FÜRTH und E. NOBEL<sup>10</sup> keine quantitativen Ergebnisse, namentlich dann nicht, wenn es sich um die Bestimmung des Tryptophans in Proteinhydrolysaten handelt. — Neuerdings hat I. K. RAGINS<sup>11</sup> ein Verfahren mit Vanillin-Salzsäure beschrieben.

δ) Bestimmung von Tryptophan und Tyrosin nebeneinander. αα) Colorimetrisch-acidimetrisches Verfahren von J. TILLMANS, P. HIRSCH und F. STOPPEL<sup>12</sup>. Das Verfahren beruht auf der Anwendung der Xanthoproteinreaktion (S. 605). Es wurde im Gegensatz zu C. TH. MÖRNER<sup>13</sup> gefunden, daß eine Proportionalität zwischen der Farbenintensität der nitrierten Aminosäuren und ihrer Konzentration besteht; ferner daß die Stärke der Gelbfärbung in sauren und alkalischen Lösungen bei Tryptophan und Tyrosin eine verschiedene ist.

Zur Nitrierung wird das Gemisch von Tryptophan und Tyrosin bzw. die Proteinlösung oder -suspension 2 Stunden auf dem kochenden Wasserbade mit 0,1 N.-Salpetersäure<sup>14</sup> erhitzt, die Lösung unter Lackmüstüpfelung neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Als Standardlösung wird eine Lösung von 50 mg m-Nitro-phenol (Schmelzp. 96°) in 500 ccm 0,1 N.-Natronlauge verwendet, gegen die Lösungen von nitriertem Tryptophan und Tyrosin bei verschiedenen Stufen, z. B.  $p_{H_1} = 1,8$  und bei  $p_{H_1} = 11,5$ , colorimetrisch eingestellt werden. Mit den Farbstärken dieser Lösungen wird die Farbstärke der zu untersuchenden nitrierten Lösung verglichen und dadurch ihr Gehalt an Tryptophan und Tyrosin berechnet.

ββ) Verfahren von O. FOLIN und V. CIOCALTEU<sup>15</sup>. Die durch Natronlauge hydrolysierte Proteinlösung wird mit Schwefelsäure angesäuert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Zur Bestimmung des Tyrosins wird in einem aliquoten Teile das Tryptophan in schwefelsaurer Lösung mit Mercurisulfat gefällt und das Filtrat mit einer Tyrosin-Standardlösung von gleichem Schwefelsäure- und Mercurisulfatgehalt nach dem Kochen

<sup>1</sup> E. KOMM: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 156, 35, 161, 202.

<sup>2</sup> J. TILLMANS u. A. ALT: Biochem. Zeitschr. 1925, 164, 135.

<sup>3</sup> SANDERS u. MAY: Biochem. Journ. 1913, 2, 273.

<sup>4</sup> O. FOLIN u. M. LOONEY: Journ. Biol. Chem. 1922, 51, 421.

<sup>5</sup> C. E. MAY u. E. R. ROSE: Journ. Biol. Chem. 1923, 54, 213; C. 1923, I, 770.

<sup>6</sup> P. A. LEVENE u. C. A. ROUILLER: Journ. Biol. Chem. 1907, 2, 481; C. 1907, I, 1461; Biochem. Zeitschr. 1907, 4, 322.

<sup>7</sup> H. FASAL: Biochem. Zeitschr. 1912, 44, 392; 1913, 55, 88.

<sup>8</sup> A. HOMER: Journ. Biol. Chem. 1915, 22, 369.

<sup>9</sup> E. HERZFELD: Biochem. Zeitschr. 1913, 56, 258.

<sup>10</sup> O. FÜRTH u. E. NOBEL: Biochem. Zeitschr. 1920, 109, 103. — O. FÜRTH u. F. LIEBEN: Biochem. Zeitschr. 1920, 109, 124.

<sup>11</sup> J. K. RAGINS: Journ. Biol. Chem. 1928, 80, 543; C. 1929, I, 1382.

<sup>12</sup> J. TILLMANS, P. HIRSCH u. F. STOPPEL: Biochem. Zeitschr. 1928, 198, 379; 1930, 217, 422.

<sup>13</sup> C. TH. MÖRNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1919, 107, 203.

<sup>14</sup> Die 0,1 N.-Salpetersäure muß etwas Salpetrige Säure enthalten und wird daher vorteilhaft aus einer konz. Salpetersäure hergestellt, die etwa 10% rauchende Salpetersäure enthält (vgl. auch H. BAUER u. E. STRAUSS: Biochem. Zeitschr. 1929, 211, 191).

<sup>15</sup> O. FOLIN u. V. CIOCALTEU: Journ. Biol. Chem. 1927, 73, 627; C. 1927, II, 2089.

und Natriumnitritzusatz (MILLONs Reagens) verglichen. Zur Bestimmung des Tryptophans wird der Mercurisulfatniederschlag entweder mit Schwefelwasserstoff oder durch Kochen mit Salzsäure zersetzt und der Tryptophangehalt mit Phenolreagens — im letzteren Falle nach Zusatz von Kaliumcyanid oder -sulfocyanid — gegen eine Tryptophan-Standardlösung colorimetriert. — W. D. McFARLANE und H. L. FULMER<sup>1</sup> entfernen aus dem alkalischen Hydrolysate die Eigenfarbe mit Kaolin und sonstige störende Stoffe durch Extraktion mit Toluol und erhalten so zuverlässigere Werte. — O. FOLIN und A. D. MARENZI<sup>2</sup> geben ein entsprechendes Mikroverfahren an.

γγ) Verfahren von O. FOLIN und J. M. LOONEY<sup>3</sup>. Das Verfahren beruht auf der Blaufärbung von Tyrosin und Tryptophan mit Phosphormolybdänsäure. Das Tryptophan wird durch Mercurisulfat gefällt und abgeschleudert. Das Filtrat sowie der in Natriumcyanidlösung gelöste Niederschlag werden beide mit Phosphormolybdänsäure gegen Standardlösungen von Tyrosin und Tryptophan colorimetriert. O. FÜRTH und Z. DISCHE<sup>4</sup> konnten nach diesem Verfahren in reinen Lösungen der beiden Aminosäuren gute Ergebnisse erhalten, nicht aber in Proteinhydrolysaten.

### III. Amine.

Amine, Derivate des Ammoniaks, in welchen die Wasserstoffatome des Ammoniaks durch Kohlenwasserstoffreste substituiert sind, sind schon lange als Produkte der Proteinfäulnis bekannt (proteinogene Amine) und finden sich in Lebensmitteln, wenn auch nur in geringeren Mengen, da, wo ein Abbau von Proteinen durch Bakterien und Hefen erfolgt. Amine entstehen ferner auch durch den tierischen Organismus beim Abbau von Proteinen und finden sich auch in einigen Pflanzen.

Im Nachfolgenden sollen nur der Nachweis und die Bestimmung der niederen aliphatischen Amine, soweit sie in Lebensmitteln vorkommen oder bei deren Zersetzung vorkommen können, behandelt werden. Über den Nachweis und die Bestimmung weiterer Amine, die zum Teil giftige Eigenschaften besitzen sollen, siehe den Abschnitt „Ausmittlung der Gifte“ (S. 1273), ferner über die Entstehung und Einteilung der Amine Bd. I, S. 151 dieses Handbuchs.

#### Eigenschaften der einfachen Methyl- und Äthylamine.

Je nach der Zahl und der Natur der den Ammoniak-Wasserstoff ersetzenden Kohlenwasserstoffreste besitzen diese Amine verschiedene Eigenschaften.

Nach der Zahl der ersetzten Wasserstoffatome unterscheidet man primäre ( $\text{NH}_2 \cdot \text{R}$ ), sekundäre ( $\text{NH} \cdot \text{R}_2$ ) und tertiäre ( $\text{N} \cdot \text{R}_3$ ) Amine. Alle hier in Frage kommenden Amine sind Gase oder unzersetzt flüchtige, in Wasser leicht lösliche Flüssigkeiten von ammoniakähnlichem Geruch und sind leicht entzündlich bzw. brennbar; sie besitzen einen basischen Charakter, der stärker ist als der des Ammoniaks; die sekundären Amine sind stärker basisch als die primären und letztere wiederum stärker basisch als die tertiären. Wie das Ammoniak in seinen wäßrigen Lösungen zum Teil als Ammoniumhydroxyd vorhanden ist, so enthalten auch die wäßrigen Lösungen von Alkylaminen jenem analog gebaute alkalische Alkylammoniumhydroxyde neben freien Aminen.

Mono-, Di- und Tri-methylamine geben mit NESSLERs Reagens ähnliche Fällungen wie Ammoniak, während aber die Fällungen des letzteren sowie des Mono-methylamins im Überschuß des Reagens unlöslich sind, lösen sich die Fällungen des Di- und Trimethylamins im Überschuß des Reagens.

<sup>1</sup> W. D. McFARLANE u. H. L. FULMER: Biochem. Journ. 1930, 24, 1601; C. 1931, II, 1170.

<sup>2</sup> O. FOLIN u. A. D. MARENZI: Journ. Biol. Chem. 1929, 83, 89; C. 1929, II, 2082.

<sup>3</sup> O. FOLIN u. J. M. LOONEY: Journ. Biol. Chem. 1922, 51, 421; C. 1922, IV, 349.

<sup>4</sup> O. FÜRTH u. Z. DISCHE: Biochem. Zeitschr. 1924, 146, 275.

Tabelle 2. Spez. Gewichte und Siedepunkte der Methyl- und Äthylamine, sowie Schmelzpunkte ihrer wichtigsten Salze.

| Bezeichnung und Formel  | Spez. Gewicht                  | Siedepunkt Grad | Schmelzpunkte    |                          |                   |                |                      |                  |                                |  |
|---|--------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|-------------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------------------|--|
|   |                                |                 | Chlorhydrat Grad | Pikrat Grad              | Pikrolonat Grad   | Flavianat Grad | Chloroplatinat Grad  | Chloroaurat Grad | $\alpha$ -Naphthylurethan Grad |  |
| Methylamin $\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_3$  | 0,699<br>(-10,8 <sup>0</sup> ) | -6,7            | —                | 215 (207)<br>(w)         | 244 (w)           | 265—268<br>(m) | 224 (w)              | —                | 196—197<br>(l)                 |  |
| Dimethylamin<br>$\text{NH} \cdot (\text{CH}_3)_2$                                 | 0,6865<br>(-5,8 <sup>0</sup> ) | 7,2             | —                | 155—156<br>(w)           | 223 (w)           | 230—235<br>(m) | 206                  | 202              | 158—159<br>(l)                 |  |
| Trimethylamin<br>$\text{N} \cdot (\text{CH}_3)_3$                                 | 0,662<br>(-5,2 <sup>0</sup> )  | 3,5             | —                | 216 (w)                  | 250—252<br>(w, a) | 217—223<br>(m) | 242—243<br>(w)       | 232—243<br>(w)   | —                              |  |
| Äthylamin $\text{NH}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5$                                | 0,6994<br>(8 <sup>0</sup> )    | 16,5            | —                | Oxalat <sup>1</sup><br>— | 244* (w)          | —              | —                    | —                | 199—200<br>(l)                 |  |
| Diäthylamin<br>$\text{NH} \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_2$                         | 0,7116<br>(15 <sup>0</sup> )   | 55,5            | 223,5<br>(a)     | 220 (w)                  | 260 (w)           | —              | 251—252 <sup>2</sup> | 162 <sup>2</sup> | 127—128<br>(l)                 |  |
| Triäthylamin<br>$\text{N} \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_3$                         | 0,7331<br>(15 <sup>0</sup> )   | 89,0            | 253—254<br>(a)   | 173 (w)                  | 161 (w)           | —              | —                    | < 100            | —                              |  |
| Methyl-äthylamin<br>$\text{NH} \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5$      | —                              | 34—35           | 133 (a)          | 154—155<br>(a)           | —                 | —              | 208                  | 179—180<br>(w)   | —                              |  |
| Dimethyl-äthylamin<br>$\text{N} \cdot (\text{CH}_3)_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5$ | —                              | 37,5            | 221—222<br>(a)   | —                        | —                 | —              | 215 (a)              | 206 (w)          | —                              |  |

Es bedeutet (w) aus Wasser, (a) aus Äthylalkohol, (m) aus Methylalkohol, (l) aus Ligroin kristallisiert.  
<sup>1</sup> Saure Oxalate.      <sup>2</sup> Bromverbindungen.

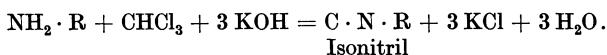
Das Chlorhydrat des Mono-methylamins ist unlöslich in Chloroform (Äther, Aceton), die des Di- und Tri-methylamins sind löslich darin.

Infolge ihres basischen Charakters addieren die Amine leicht Säuren und bilden Alkyl-ammoniumsalze, die zum Teil zur Kennzeichnung der Amine geeignet sind. Die Tabelle auf S. 637 enthält eine Zusammenstellung der Spez. Gewichte und Siedepunkte, sowie der Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte solcher Salze, die neben den unter A beschriebenen Verfahren zur Kennzeichnung der einzelnen Amine dienen können.

## A. Nachweis von Methyl- und Äthylaminen.

### 1. Nachweis der einzelnen Amine.

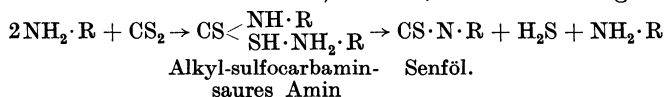
a) **Primäre Amine.**  $\alpha$ ) Isonitrilreaktion nach A. W. HOFMANN<sup>1</sup>. Das in Alkohol gelöste Amin wird mit alkoholischer Kalilauge und einigen Tropfen Chloroform erwärmt:



Das entweichende Isonitril ist an dem eigenartigen, unangenehmen Geruch erkenntlich. Die Reaktion gelingt nach M. WADEWITZ und B. RASSOW<sup>2</sup> am besten, wenn man nach Beendigung der Reaktion, kenntlich an der Ausscheidung von Kaliumchlorid, eine Probe mit einem Glasstab entnimmt und sie in den durch die Nase ausgeatmeten Luftstrom bringt; die ausgeatmete Kohlensäure bindet das Alkali und setzt das flüchtige Nitril in Freiheit.

Einige Aminosäuren, z. B. Glykokoll und Alanin, geben die Isonitrilreaktion ebenfalls.

$\beta$ ) Senfölsreaktion nach A. W. HOFMANN<sup>3</sup>. Die alkoholische Lösung des Amins wird mit der gleichen Menge Schwefelkohlenstoff erwärmt und, nachdem der Alkohol zum Teil verdampft ist, mit Entschwefelungsmitteln (Mercurichlorid, Silbernitrat oder Ferrichlorid) erhitzt; es tritt Senfölsgeruch auf.



$\gamma$ ) Sonstige Reaktionen. Primäre Amine zersetzen sich mit Salpetriger Säure unter Stickstoffbindung (S. 639); Metaphosphorsäure<sup>4</sup> fällt sie aus ätherischer Lösung; Nitroprussidnatrium und Aceton<sup>5</sup> geben eine rotviolette Färbung.

b) **Sekundäre Amine.** Sekundäre Amine reagieren mit Salpetriger Säure unter Bildung von Nitrosaminen (S. 639), mit Phenylsulfochlorid in Kalilauge geben sie unlösliche Sulfonamide (S. 639) und mit Dibrompenta Piperidiniumbromid<sup>6</sup>.

c) **Tertiäre Amine.**  $\alpha$ ) Tertiäre Amine geben mit Kaliumferrocyanid schwer lösliche Niederschläge, z. B. Trimethylamin einen solchen von der Zusammensetzung:  $[\text{N} \cdot (\text{CH}_3)_3]_2 \cdot \text{H}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Nach E. FISCHER<sup>7</sup> tropft man in die verdünnte Lösung des Hydrochlorids eine etwa äquivalente Menge wässriger Kaliumferrocyanidlösung und krystallisiert den mit Alkohol gewaschenen Niederschlag aus letzterem um.

Beim Umkrystallisieren aus Wasser zersetzt sich der Niederschlag unter Bildung von Berlinerblau.

<sup>1</sup> A. W. HOFMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1870, **3**, 767.

<sup>2</sup> M. WADEWITZ u. B. RASSOW: Zeitschr. angew. Chem. 1924, **37**, 191.

<sup>3</sup> A. W. HOFMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1868, **1**, 171; 1870, **3**, 767; 1875, **8**, 107.

<sup>4</sup> SCHLÖMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1893, **26**, 1023.

<sup>5</sup> E. RIMINI: Annali di Farmacoterap. et Chim. **1**, 193; Chem.-Ztg. 1898, **22**, Rep. 199.

<sup>6</sup> J. v. BRAUN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, **41**, 2156.

<sup>7</sup> E. FISCHER: Ann. Chem. 1878, **190**, 183.

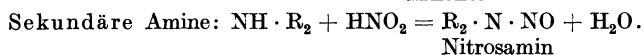
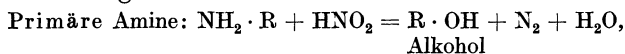
β) Behandelt man ein Amingemisch mit einer überschüssigen ätherischen Lösung von Methyl-magnesiumjodid, verjagt den Äther und erhitzt den Rückstand auf 200—280°, so destilliert nach H. HIBBERT und A. WISE<sup>1</sup> das reine tertiäre Amin über, während die Additionsverbindungen der primären und sekundären Amine unter Methanentwicklung sich zu den recht beständigen Verbindungen  $R \cdot NH[MgJ]$  und  $R_2 \cdot N[MgJ]$  umsetzen.

γ) Nachweis von Trimethylamin nach D. VORLÄNDER und O. NOLTE<sup>2</sup>. Man gibt zu der wäßrigen 10%igen Aminlösung unter Umschütteln und anfangs unter Kühlung in Eiswasser tropfenweise Benzolsulfchlorid, bis die Lösung schwach sauer oder nahezu neutral reagiert und ein kleiner Überschuß von Sulfochlorid vorhanden ist. Nachdem die Lösung zur Entfernung des letzteren und etwaiger Sulfamide mit Äther ausgeschüttelt ist, säuert man an und setzt Platinchloridlösung hinzu, worauf bei Gegenwart von Trimethylamin die Ausscheidung von Phenyl-sulfuryl-ammoniumplatinchlorid —  $[C_6H_5SO_2N(CH_3)_3]_2PtCl_6$  — als hellgelber kristalliner Niederschlag erfolgt, der nach  $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen in Eis abfiltriert und aus heißem Wasser umkristallisiert wird. 40 mg Trimethylamin sind in 5 ccm Lösung noch nachweisbar; Methyl- und Dimethylamin geben die Reaktion nicht, da ihre Chloroplatinate wasserlöslich sind. Alkohol fördert die Ausbeute. Schmelzp. 215—220°.

## 2. Nachweis primärer, sekundärer und tertiärer Amine nebeneinander.

Außer den unter 1 aufgeführten Reaktionen zum Nachweise der verschiedenen Amine können noch folgende Verwendung finden:

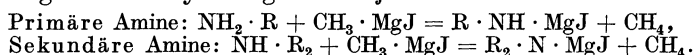
a) Verhalten gegen Salpetrige Säure. Versetzt man die angesäuerte, konzentrierte wäßrige Aminhydrochloridlösung mit einer konz. Kaliumnitritlösung, so finden folgende Reaktionen statt:



Tertiäre Amine reagieren entweder überhaupt nicht oder unter Abbau.

Die Nitrosamine sind in Wasser nur wenig lösliche, mit Wasserdampf destillierbare Flüssigkeiten, die aus dem Destillat mit Äther ausgezogen werden können und die LIEBERMANNsche Nitrosoreaktion<sup>3</sup> — Blaufärbung mit Phenol und konz. Schwefelsäure — geben.

b) Verhalten gegen Methyl-magnesiumjodid. Nach J. J. SUDBOROUGH und H. HIBBERT<sup>4</sup> reagieren primäre und sekundäre Amine in amyliätherischer Lösung mit Methyl-magnesiumjodid in der Kälte nach den Gleichungen:



Beim Erhitzen liefern primäre Amine ein zweites Mol Methan. Tertiäre Amine reagieren überhaupt nicht mit Methyl-magnesiumjodid. In der zweiten Mitteilung empfehlen die Verfasser die Verwendung von Phenetol statt Amyliäther.

c) Sonstige Verfahren. Verhalten gegen Dibrompentan<sup>5</sup>, gegen Phenolsulfochlorid bzw. Anthrachinonsulfochlorid<sup>6</sup> und gegen Xylylenbromid<sup>7</sup>. — Vgl. ferner die quantitative Trennung mittels der Chlorhydrate, S. 641.

<sup>1</sup> H. HIBBERT u. A. WISE: Journ. Chem. Soc. London 1912, 101, 344; C. 1912, I, 1502.

<sup>2</sup> D. VORLÄNDER u. O. NOLTE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1913, 46, 3212.

<sup>3</sup> LIEBERMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1882, 15, 1529.

<sup>4</sup> J. J. SUDBOROUGH u. H. HIBBERT: Proceed. Chem. Soc. 1904, 20, 165; C. 1904, II, 415. — Journ. Chem. Soc. London 1909, 95, 477; C. 1909, I, 1643.

<sup>5</sup> J. v. BRAUN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, 41, 2156.

<sup>6</sup> O. HINSBERG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1890, 23, 2962; 1900, 33, 3526. — Vgl. auch W. SSOLOMINA: Journ. russ. phys. chem. Ges. 29, 404; 31, 640; C. 1897, II, 848; 1899, II, 867.

<sup>7</sup> M. SCHOLTZ: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1898, 31, 1707.



### 3. Nachweis von Aminen neben Ammoniak.

a) Nach M. FRANÇOIS<sup>1</sup> verbindet sich Ammoniak mit gelbem Mercurioxyd zu Ammonium-mercurioxyd, während die Methyl- und Äthylamine nicht mit Mercurioxyd reagieren. Zur Reinigung auf trockenem Wege leitet man das Gasgemisch über eine lange Schicht von gekörntem gelbem Mercurioxyd; man erhält so völlig ammoniakfreie Amine. Die Reinigung auf nassem Wege geschieht in der Weise, daß man die wäßrige Aminlösung mit überschüssigem gelbem Mercurioxyd (430 g Mercurioxyd absorbieren 17 g Ammoniak) 1 Stunde lang schüttelt, die Flüssigkeit durch ein Filter dekantiert, mit etwas Wasser auswäscht, mit etwas Natronlauge und gesättigter Natriumcarbonatlösung (gleiche Volumen) nochmals 1 Stunde mit Mercurioxyd schüttelt und filtriert, ohne das Mercurioxyd auszuwaschen. Dieses Verfahren arbeitet wesentlich schneller als das trockene und liefert Amine mit höchstens 0,2% Ammoniak.

Das Ammonium-mercurioxyd zersetzt man mit Ameisensäure (S. 642) und destilliert das Ammoniak ab; ebenso werden die Amine aus dem Filtrat vom Ammonium-mercurioxyd mit Alkalilauge abdestilliert und titrimetrisch bestimmt.

b) Ein weiteres Verfahren zur Trennung des Ammoniaks von aliphatischen Aminen beruht nach P. LEONE<sup>2</sup> auf der Fällung des Ammoniaks in wäßrig-alkoholischer Lösung als Ammonium-kobaltnitrit.

### 4. Nachweis von Alkylaminen nebeneinander und neben Ammoniak.

Nach H. E. WOODWARD und C. L. ALSBERG<sup>3</sup> kann der Nachweis, wie folgt, geschehen: Während Ammoniak mit Formaldehyd unter Bildung von Hexamethylen-tetramin reagiert, erzeugen flüchtige Amine daraus Methylalkohol und Ameisensäure, von denen letztere durch Reduktion von Mercuribromid zu Mercurobromid — zweckmäßig in Kaliumjodidlösung — nachgewiesen werden kann. — Trimethyl- und Triäthylamin können neben den Mono- und Dialkylverbindungen durch MAYERS Reagens (13,55 g Mercurichlorid werden in einer konz. Lösung von 50,0 g Kaliumjodid gelöst und zu 1000 ccm aufgefüllt) nachgewiesen werden, das damit in saurer Lösung noch in starker Verdünnung Ausscheidungen von der Zusammensetzung  $R_3N \cdot HJ \cdot HgJ_2$  gibt, die dem Gemisch durch eine Mischung gleicher Teile Chloroform und Äthylacetat entzogen werden können. Die Methylverbindung schmilzt bei 136°, die Äthylverbindung bei 77°. — Ammoniak verursacht keine Ausscheidung; sekundäre Amine reagieren nur in konz. Lösungen. — Man verfährt folgendermaßen: Man destilliert und fängt Ammoniak und Amine in vorgelegter Säure auf. Dann konzentriert man die Lösung, gibt Natronlauge zu, destilliert wieder und fängt in einem Reagensglase, das 1 ccm 40%ige Formaldehydlösung enthält, auf. Alsdann fügt man 1 ccm einer Lösung hinzu, die in 100 ccm 18,0 g Mercuribromid und 12,0 g Kaliumbromid enthält, und erwärmt kurz im Wasserbade. Sind Amine anwesend, so ist der entstehende Niederschlag in Formaldehyd unlöslich.

## B. Bestimmung von Methyl- und Äthylaminen.

### 1. Bestimmung von Trimethylamin.

Da primäre und sekundäre Amine ebenso wie Ammoniak und Aminosäuren (S. 619) durch Salpetrige Säure eine Umsetzung erfahren (S. 639), während die tertiären Amine damit in saurer Lösung überhaupt nicht reagieren und

<sup>1</sup> M. FRANÇOIS: Compt. rend. Paris 1907, 144, 567; C. 1907, I, 1511. — Vgl. auch H. FRANZEN u. A. SCHNEIDER: Biochem. Zeitschr. 1921, 116, 195.

<sup>2</sup> P. LEONE: Gazz. chim. Ital. 1925, 55, 246; C. 1925, II, 1781.

<sup>3</sup> H. E. WOODWARD u. C. L. ALSBERG: Journ. Biol. Chem. 1921, 46, 1; C. 1921, IV, 319.

unzersetzt bleiben, kann man die tertiären Amine (Trimethylamin) in der Weise bestimmen<sup>1</sup>, daß man Ammoniak und Amine aus der zu untersuchenden Flüssigkeit mit Magnesiumoxyd abdestilliert und in 0,1 N.-Säure auffängt. Man versetzt das Destillat in einem Destillierkolben mit 15—20 g Natriumnitrit und 25 g konz. Essigsäure und bringt das Gesamtvolumen auf etwa 300 ccm. Die Flüssigkeit wird 40 Minuten lang gekocht, darauf etwas Bimsstein und Lackmuspapier und nunmehr vorsichtig 50 ccm 30%ige Natronlauge zugesetzt und  $\frac{3}{4}$  der Flüssigkeit in vorgelegte 0,1 N.-Säure abdestilliert. Zur Entfernung der Kohlensäure wird das Destillat 10—15 Minuten aufgekocht und mit 0,1 N.-Alkalilauge unter Verwendung von Rosolsäure als Indicator der Säureüberschuß zurücktitriert. 1 ccm 0,1 N. Säure = 5,31 mg Trimethylamin [ $N(CH_3)_3$ ].

## 2. Bestimmung von Aminen neben Ammoniak.

a) **Trimethylamin neben Ammoniak nach K. BUDAI**<sup>2</sup>. Man bestimmt das Ammoniak durch Titration (a ccm 0,1 n) bei Gegenwart von Formaldehyd nach S. 645 in neutraler Lösung<sup>3</sup>; kocht man die dabei entstehende wäbrig Hexamethylen-tetraminlösung mit verd. Säure, so nimmt die Reaktion den umgekehrten Verlauf, und es entsteht aus dem Hexamethylen-tetramin Trimethylamin. Zur Bestimmung des ursprünglich vorhandenen Trimethylamins wird die mit viel Wasser verdünnte titrierte Lösung nach dem Ansäuern mit konz. Salzsäure über freier Flamme auf  $\frac{1}{3}$  ihres Volumens eingedampft und nach dem Übersättigen mit Lauge das ursprünglich vorhandene und das aus dem Hexamethylen-tetramin neugebildete Trimethylamin in titrierte Säure überdestilliert (b ccm 0,1 n). Die Differenz der so und der zur Bestimmung des Ammoniaks verbrauchten Kubikzentimeter 0,1 N.-Lauge (b — a) entspricht dem Gehalt der untersuchten Lösung an Trimethylamin.

Die Gegenwart von Dimethylamin stört die obigen Bestimmungen nicht, dagegen soll nach F. OKOLOFF<sup>4</sup> die Gegenwart von Monomethylamin störend wirken. Will man die störende Wirkung des letzteren, allerdings in größeren Mengen in Lebensmitteln nicht vorkommenden Amins ausschließen, so trennt man die Ammoniumsalze von den Aminsalzen durch Alkohol<sup>5</sup>, in dem die Chloride und Sulfate des Ammoniums unlöslich, dagegen die der Amine löslich sind.

b) **Mono-, Di- und Tri-methylamine neben Ammoniak nach H. FRANZEN und A. SCHNEIDER**<sup>6</sup>. Das Verfahren beruht einerseits auf der Trennung des Ammoniaks von den Aminen mittels Mercurioxyds nach M. FRANÇOIS (S. 640) und andererseits auf der Abscheidung des Trimethylamins als Perjodid nach J. BERTHEAUME<sup>7</sup>.

Man verfährt, wie folgt: 1—2 g der bei 110° getrockneten Chlorhydrate löst man in etwas salzsäurehaltigem Wasser, mischt mit mindestens 20 g Quarzsand, trocknet die Mischung scharf im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure und zieht sie in einem SOXHLET-Apparat erschöpfend mit Chloroform aus. Hierbei gehen die Chlorhydrate des Di- und Trimethylamins in Lösung, während die des Methylamins und Ammoniaks ungelöst bleiben. Die Chloroformlösung wird zur Trockne gebracht, der Rückstand gewogen, in der 2000fachen Menge Wasser gelöst, auf 0° abgekühlt, auf je 100 ccm mit 30 ccm auf 0° abgekühlter Jod-Kaliumjodidlösung (12,7 g Jod und 15 g Kaliumjodid zu

<sup>1</sup> F. OKOLOFF: Z. 1932, 63, 129.

<sup>2</sup> K. BUDAI: Zeitschr. physiol. Chem. 1913, 86, 107. — Vgl. auch F. OKOLOFF: Z. 1932, 63, 143.

<sup>3</sup> Monomethylamin geht dabei in Methyl-methylamin und Dimethylamin in Tetramethyl-methylendiamin über, welche beide die Reaktion nicht stören sollen.

<sup>4</sup> F. OKOLOFF: Z. 1932, 63, 143.

<sup>5</sup> H. FLECK: Journ. Amer. Chem. Soc. 1896, 18, 670.

<sup>6</sup> H. FRANZEN u. A. SCHNEIDER: Biochem. Zeitschr. 1921, 116, 195.

<sup>7</sup> J. BERTHEAUME: Compt. rend. Paris 1910, 150, 1251; C. 1910, II, 245.

100 ccm mit Wasser gelöst) versetzt und 1 Stunde lang bei 0° stehen gelassen. Hierbei scheidet sich das Trimethylamin als Perjodid ab; es wird abgesaugt, mit wenig 1 + 3 verdünnter Jod-Kaliumjodidlösung nachgewaschen, in Natriumsulfidlösung gelöst und aus der alkalisch gemachten Lösung wird das Trimethylamin überdestilliert und titriert. Das Filtrat von der Jodidfällung wird mit Natriumsulfidlösung entfärbt, daraus das Dimethylamin in gleicher Weise wie das Trimethylamin abdestilliert und titriert. Der Rückstand in der Extraktionshülse wird mit heißem Wasser ausgezogen, die Lösung unter Zusatz von etwas Natriumhydroxyd- und Natriumcarbonatlösung mit gelbem Mercurioxyd geschüttelt, wobei das Ammoniak in unlösliches Ammoniummercurioxyd übergeht (S. 640). Dieses wird mit überschüssiger Ameisensäure auf dem Wasserbade erwärmt, das Mercurioxyd dadurch zu Quecksilber reduziert und das Ammoniak in Freiheit gesetzt. Es wird nach dem Alkalischemachen abdestilliert und titriert. Wenn aus dem Filtrat der Mercurioxydfällung das Monomethylamin durch Alkalizusatz und Destillation abgeschieden und dann titriert wird, so verbleibt ein Teil des Monomethylamins beim Mercurioxyd. Um diesen Fehler zu vermindern, reichert man zunächst das Monomethylamin durch Ausziehen der Chlorhydrate mit absol. Alkohol an.

Hinsichtlich der Äthylamine ist zu beachten, daß sich diese gegen Mercurioxyd ebenso verhalten wie die Methylamine, dagegen lassen sich die Chlorhydrate des Di- und Triäthylamins und des Monoäthylamins nicht durch Chloroform trennen, in dem sie alle drei löslich sind; ebenso ist eine Trennung von Di- und Triäthylamin mit Hilfe der Perjodide nicht möglich.

## IV. Ammoniak.

### A. Nachweis des Ammoniaks.

Größere Mengen von Ammoniakverbindungen lassen sich beim Erwärmen der Substanz mit Alkalilauge leicht an dem kennzeichnenden Geruch des Ammoniaks sowie durch die Bläuung von rotem Lackmuspapier durch dieses Gas erkennen.

Am empfindlichsten ist die **Reaktion mit alkalischer Kaliumquecksilberjodidlösung (NEISSERs Reagens)**. Seine Wirkung beruht auf der Bildung eines rötlichbraunen Niederschlages oder bei sehr verdünnten Lösungen einer gelben Lösung von Dimercuriammoniumjodid ( $\text{JNHg}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

Nach K. W. CHARITSCHKOW<sup>1</sup> geben auch einige Amine mit NESSLERs Reagens ähnliche Verbindungen wie das Ammoniak.

Das Reagens wird in folgender Weise bereitet:

50 g Kaliumjodid werden in etwa 50 ccm heißem Wasser gelöst und mit einer konz. Mercurichloridlösung versetzt, bis der dadurch gebildete rote Niederschlag sich nicht mehr löst; hierzu sind 20—25 g Mercurichlorid erforderlich. Man filtriert, vermischt mit einer Lösung von 150 g Kaliumhydroxyd in 300 ccm Wasser, verdünnt auf 1 Liter, fügt noch etwa 5 ccm Mercurichloridlösung hinzu, läßt den dabei entstehenden Niederschlag absitzen und dekantiert. Die Lösung muß in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt werden<sup>2</sup>.

L. W. WINKLER<sup>3</sup> empfiehlt folgendes Reagens: 1,0 g Mercurijodid wird mit 5,0 g Kaliumbromid und 2,5 g Natriumhydroxyd in 25 ccm Wasser gelöst; zu dieser Lösung gibt man 75 ccm Wasser, und zwar am besten statt destillierten Wassers farbloses natürliches Wasser von etwa 10° Härte. Die zur Ausscheidung gelangenden Calciumcarbonat und Magnesiumhydroxyd wirken hierbei als Klärmittel; nach etwa 10stündigem Stehen ist das über dem Niederschlage stehende Reagens vollständig klar und farblos. Da es reichlich Salz und verhältnismäßig wenig Alkalihydroxyd enthält, kittet es den Glasstopfen der Aufbewahrungsflasche kaum ein.

<sup>1</sup> K. W. CHARITSCHKOW: Journ. russk. phys.-chim. obschtsch. 1906, 38, 1067; Z. 1908, 16, 489.

<sup>2</sup> Über ein neues NESSLER-FOLINSches Reagens berichten F. C. KOCH u. F. L. McMEEKIN (Journ. Amer. Chem. Soc. 1924, 46, 2066; Z. 1927, 53, 281).

<sup>3</sup> L. W. WINKLER: Z. 1925, 49, 163.

Bei der Ausführung der Reaktion verwendet man auf 10 ccm neutrale Flüssigkeit etwa 10 Tropfen Reagens.

Enthält die Flüssigkeit — etwa zu prüfendes natürliches Wasser — alkalische Erden, so müssen diese durch Zusatz von Natriumcarbonat- und Natriumhydroxydlösung vorher abgeschieden und abfiltriert werden. Dies ist nach L. W. WINKLER nicht erforderlich, wenn man zu 10 ccm Flüssigkeit vor dem Zusatz von NESSLERS Reagens etwa 10 Tropfen Seignettesalzlösung hinzufügt.

Die Seignettesalzlösung wird hergestellt, indem man 100 g Seignettesalz in 200 ccm warmem Wasser löst, die Lösung durch Watte filtriert, 1 g Natriumhydroxyd hinzugibt, 10 Minuten lang in lebhaftem Sieden erhält und auf 250 ccm auffüllt. Die in eine Glasstöpfelflasche übergeführte Lösung wird zur Verhinderung von Schimmelbildung mit etwa 0,2 g Mercurijodid kräftig geschüttelt, das sich dabei größtenteils löst. Die durch Absetzen von etwas Mercurijodid geklärte Lösung ist gebrauchsfertig. Diese sowie die NESSLERSche Lösung werden zweckmäßig in braunen Tropfgläsern in einem Exsiccator aufbewahrt.

**Sonstige Reaktionen.** a) Reaktion von S. S. GRAVES<sup>1</sup>. Ammoniak gibt in gegen Lackmus genau neutralisierter Lösung mit einer lithiumcarbonathaltigen Lösung von Mercuri- und Natriumchlorid einen weißen Niederschlag. Das Reagens wird, wie folgt, hergestellt: Zu 80 g Natriumchlorid gibt man 150 ccm ammoniakfreies Wasser und unter Schütteln 100 ccm einer kaltgesättigten Mercurichloridlösung. Wenn das Salz aufgelöst ist, fügt man langsam 70 ccm einer gesättigten Lithiumcarbonatlösung unter Schütteln hinzu. Die infolge Ammoniakgehaltes der Salze meist trübe Lösung wird mit Talkpulver geschüttelt und filtriert. Die gut verschlossene Lösung ist längere Zeit haltbar und ebenso empfindlich wie NESSLERS Reagens.

b) Reaktion von C. D. ZENGHELIS<sup>2</sup>. Eine frisch bereitete Lösung von 1 Tl. 20%iger Silbernitratlösung und 3 Tln. 33—37%iger Formaldehydlösung scheidet bei der Berührung mit Ammoniakgas an ihrer Oberfläche einen Silberspiegel ab. 0,00034 mg NH<sub>3</sub> sind noch nachweisbar.

K. G. MAKRISS<sup>3</sup> wendet in ähnlicher Weise statt der Formaldehydlösung auf 5 ccm Silbernitratlösung 1 ccm 5%ige Tanninlösung an, wobei nach 0,005 mg NH<sub>3</sub> nachweisbar sind. Diese Reaktion kann auch in der Weise ausgeführt werden, daß das Reagens zu dem ammoniakhaltigen Destillat hinzugesetzt wird; es treten dann hellgelbe bis dunkelrote Färbungen ein.

c) Reaktion von P. A. HANSEN<sup>4</sup>. Versetzt man 5 ccm der alkalischen oder neutralen Lösung mit je 1 ccm Reagens I (2 g Thymol, 10 ccm 2 N.-Natronlauge, 90 ccm Wasser) und Reagens II (100 ccm Bromwasser, 35 ccm 2 N.-Natronlauge), so entsteht bei Gegenwart von Ammoniak nach 20 Minuten Blaufärbung; Äther nimmt den Farbstoff mit tieferer Farbe auf. Die Reaktion tritt nur in verdünnten Ammoniaklösungen auf. Empfindlichkeit (auf Stickstoff berechnet) 1:1000000. Methyl-, Dimethyl- und Trimethylamin geben die Reaktion ebenfalls, schwach auch Glykokoll und Alanin.

d) Mikrochemischer Nachweis nach G. DENIGÈS<sup>5</sup>. Spuren von Ammoniakgas verursachen auf der Oberfläche eines Tropfens 10%iger Jodsäurelösung die Bildung charakteristischer quadratischer Krystalle von Ammoniumjodat.

## B. Bestimmung des Ammoniaks.

### 1. Destillationsverfahren.

Für dieses Verfahren ist eine Reihe von Ausführungsformen vorgeschlagen worden, die sich teils auf die Abtreibung des Ammoniaks aus der Untersuchungsflüssigkeit, teils auf die Bestimmung des Ammoniaks im Destillat beziehen.

#### a) Ausführung der Destillation.

Enthält die ammoniakhaltige Lösung keine leicht zersetzlichen organischen Stickstoffverbindungen, so kann das Ammoniak unter Zusatz eines Überschusses von Natronlauge in dem oben (S. 577) beschriebenen Apparate abdestilliert,

<sup>1</sup> S. S. GRAVES: Journ. Amer. Chem. Soc. 1915, **37**, 1171; C. 1915, II, 364.

<sup>2</sup> C. D. ZENGHELIS: Compt. rend. Paris 1921, **173**, 153; C. 1921, IV, 1255.

<sup>3</sup> K. G. MAKRISS: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, **81**, 212.

<sup>4</sup> P. A. HANSEN: Zentralbl. Bakteriol. I 1930, **115**, 391; C. 1930, I, 2931.

<sup>5</sup> G. DENIGÈS: Compt. rend. Paris 1920, **171**, 177; C. 1920, IV, 456.

in einer gemessenen überschüssigen Menge titrierter Schwefelsäure aufgefangen und die nicht verbrauchte Säure alkalimetrisch bestimmt werden<sup>1</sup>.

Sind dagegen in der Lösung neben Ammoniak leicht zersetzliche organische Stickstoffverbindungen vorhanden, wie dies bei Lebensmitteluntersuchungen in der Regel der Fall ist, so bedient man sich der nachfolgenden Destillationsverfahren.

Zu beachten ist hierbei, daß sich bei der Destillation das Trimethylamin —  $N \cdot (CH_3)_3$  Siedep.  $3,5^0$  — genau so verhält wie das Ammoniak, d. h. in allen Fällen mit überdestilliert. Will man das Trimethylamin, das sich z. B. in faulenden proteinreichen Flüssigkeiten neben Ammoniak findet, ausschließen, so empfiehlt es sich, entweder das Ammoniak vorher nach dem Vorschlage von A. BAYER<sup>2</sup> als Ammoniummagnesiumphosphat abzuscheiden und nur dieses der Magnesiumoxydestillation zu unterwerfen, oder bei der Titration des Ammoniaks im Destillat das Verfahren b),  $\beta$ ) (S. 645) mit Formaldehydzusatz anzuwenden, bei dem Trimethylamin nicht reagiert<sup>3</sup>. — Über den Einfluß primärer und sekundärer Amine siehe S. 641.

$\alpha$ ) Destillation mit Magnesiumoxyd unter gewöhnlichem Druck. Die ammoniakhaltige neutrale oder schwach saure<sup>4</sup> Flüssigkeit (etwa 100 bis 200 ccm) wird nach Zusatz von kohlenstofffreiem Magnesiumoxyd in dem oben (S. 577) beschriebenen Apparate destilliert, das überdestillierte Ammoniak in titrierter Schwefelsäure aufgefangen, der Überschuß der letzteren mit Natronlauge zurücktitriert und aus der neutralisierten Säuremenge der Ammoniakstickstoff berechnet.

Durch die Destillation mit Magnesiumoxyd werden zwar die neben dem Ammoniak etwa vorhandenen organischen Stickstoffverbindungen weit weniger unter Ammoniakentbindung angegriffen als bei der Destillation mit Kalilauge, Natronlauge oder Calciumoxyd, allein auch das Magnesiumoxyd wirkt noch zersetzend auf Asparagin, Glutamin und andere Amine<sup>5</sup> ein. Bariumcarbonat und Bleihydroxyd dagegen zersetzen die Ammoniumsalze nicht vollständig.

$\beta$ ) Destillation unter vermindertem Druck: Soll die Zersetzung der Amine soviel wie möglich verhindert werden, so empfiehlt sich die Destillation unter vermindertem Druck. E. SELLIER<sup>6</sup> destilliert auch hierbei mit Magnesiumoxyd, während A. SCHITTENHELM und P. SHAFER mit Natriumcarbonat<sup>6</sup> und M. KRÜGER und O. REICH mit Kalkmilch oder Barytwasser arbeiten.

A. SCHITTENHELM<sup>7</sup> sowie P. SHAFER<sup>8</sup> empfehlen bei leicht zersetzlichen Stoffen (z. B. bei Harn) das folgende Verfahren, bei dem unter Zusatz von Natriumchlorid und Methyl- oder Äthylalkohol — letztere zwecks Verhinderung des Schäumens und Erniedrigung des Siedepunktes — gearbeitet wird.

25—50 ccm der ammoniakhaltigen Flüssigkeit werden in einen 1 Liter-Rundkolben mit doppelt durchbohrtem Stopfen gebracht. Durch die eine Durchbohrung führt ein Rohr zu einer in Eiswasser stehenden PELIGOTSchen Röhre

<sup>1</sup> Über ein indirektes Verfahren, bei dem aus der Lösung durch Zusatz einer gemessenen Menge Lauge das Ammoniak weggekocht und der Laugenüberschuß mit Säure zurücktitriert wird, vgl. P. SORS (Chem.-Ztg. 1932, 56, 156).

<sup>2</sup> A. BAYER: Chem.-Ztg. 1903, 27, 809.

<sup>3</sup> Vgl. F. OKOLOFF: Z. 1932, 63, 129.

<sup>4</sup> Ist die Lösung zu stark sauer, so daß zu ihrer Neutralisation viel Magnesiumoxyd gelöst wird, so ergeben sich nach K. TÄUFEL und C. WAGNER (Zeitschr. angew. Chem. 1928, 41, 285) Fehlbeträge an Ammoniak von 3—4%.

<sup>5</sup> Vgl. E. SELLIER: Die Bestimmung des Ammoniaks in pflanzlichen Produkten. Bull. Assoc. Chimistes Sucr. Dist. 1902/03, 20, 649; 1904, 21, 1063, 1223; Z. 1903, 6, 754; 1904, 8, 555; 1905, 10, 166.

<sup>6</sup> Auch A. HAHN u. E. KOOTZ (Biochem. Zeitschr. 1920, 105, 220) beschreiben ein auf der Verwendung von Natriumcarbonat beruhendes Verfahren zur Bestimmung von Ammoniak im Harn.

<sup>7</sup> A. SCHITTENHELM: Zeitschr. physiol. Chem. 1903, 39, 73. — Auch CH. SCHENITZKY (Biochem. Zeitschr. 1916, 76, 177) empfiehlt dieses Verfahren.

<sup>8</sup> P. SHAFER: Amer. Journ. Physiol. 1902, 8, 330; Z. 1904, 8, 161.

mit 0,1 N.-Säure, den zweiten Schenkel der PELIGOTSchen Röhre verbindet man mit der Wasserstrahlpumpe. In den Kolben gibt man 15—20 g Chlornatrium, 50 ccm Alkohol und 1 g Natriumcarbonat<sup>1</sup>. Darauf bringt man den Kolben in ein Wasserbad von 43—44<sup>0</sup><sup>2</sup> und evakuiert bis auf 10 mm-Druck. Das Ammoniak destilliert mit dem Alkohol, von dem man öfters kleine Mengen durch ein durch die zweite Durchbohrung des Stopfens gehendes Trichterrohr zugibt, über. Ist dies — in etwa 30—40 Minuten — geschehen, so läßt man durch das Trichterrohr Luft eintreten und titriert den noch vorhandenen Säureüberschuß der Vorlage unter Verwendung von Rosolsäure<sup>3</sup> als Indicator zurück.

γ) Als Mikro-Destillationsapparat für die Bestimmung kleiner Ammoniakmengen dient der Apparat von J. K. PARNAS und R. WAGNER (S. 579), an dem F. A. HOPPE-SEYLER<sup>4</sup> einige Abänderungen vorgenommen hat.

δ) Nach M. ST. NICHOLS und M. E. FOOTE<sup>5</sup> ist zur quantitativen Gewinnung von Ammoniak ein  $p_H$  der Lösung von mindestens 7,4 erforderlich; sie schlagen daher zur Bestimmung des Ammoniaks einen Phosphatpuffer von  $p_H = 7,4$  vor.

### b) Bestimmung des Ammoniaks im Destillat.

Die Bestimmung des Ammoniums kann natürlich in der bekannten Weise als Ammoniumplatinchlorid erfolgen; in der Praxis bedient man sich jedoch dieses Verfahrens nicht, sondern eines der folgenden:

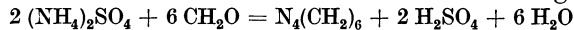
α) Alkalimetrische Titration. Die Bestimmung des Ammoniaks in einem Destillat wird in der Regel in der Weise ausgeführt, daß das Ammoniak in einer gemessenen Menge titrierter Schwefel- oder Salzsäure aufgenommen und der Säureüberschuß mit Alkalilauge zurücktitriert wird. 1 ccm N.-Säure neutralisiert 0,01404 g Ammoniak-Stickstoff = 0,01706 g Ammoniak (NH<sub>3</sub>).

Indicatoren. Der Umschlagspunkt liegt bei Ammoniumsulfat bei  $p_H = 5,7$  und bei Ammoniumchlorid bei  $p_H = 5,1$ . L. H. BAILEY<sup>6</sup> bezeichnet daher Bromkresolgrün (Tetrabrom-m-Kresolphthalein-sulfonsäure) als den geeignetsten Indicator, da sein Umschlagsgebiet zwischen  $p_H = 4,0$ —5,6 liegt und seine Farbe von Gelb (sauer) über die Zwischenstufe Grün (neutral) nach Blau (alkalisch) geht.

Andere bei der Titration vielfach verwendete Indicatoren sind Cochenille (4—6), Methylrot (4,0—6,3), Kongorot; ferner sind geeignet Chlorphenolrot (4,8—6,4), Bromkresolpurpur (5,2—6,8) usw.; siehe S. 195.

E. B. R. PRIDEAUX<sup>7</sup> empfiehlt die potentiometrische Titration des Ammoniaks.

β) Titration nach Formaldehydzusatz<sup>8</sup>. Da Ammoniumsulfat und Formaldehyd sich bei Überschuß des letzteren in neutraler Lösung nach der Formel



unter Bildung von Hexamethyltetramin und freier Schwefelsäure umsetzen, kann man Ammoniak in der Weise bestimmen, daß man die unter Verwendung von Phenolphthalein neutralisierte ammoniakhaltige Lösung mit einer neutralen Formaldehydlösung versetzt und die entstandene Säure mit Alkalilauge titriert.

<sup>1</sup> Natriumcarbonat soll nach den genannten Autoren weniger zersetzend auf etwa gleichzeitig vorhandene andere Stickstoffverbindungen einwirken als Magnesiumoxyd sowie Barium- und Strontiumhydroxyd. M. KRÜGER und O. REICH (Zeitschr. physiol. Chem. 1903, 39, 165), welche ebenfalls die Destillation im Vakuum unter Alkoholzusatz empfehlen, schlagen zur Destillation die Verwendung von Kalkmilch oder Barytwasser vor, die im Gegensatz zum Magnesiumoxyd nicht zersetzend auf andere Stickstoffverbindungen wirken sollen.

<sup>2</sup> Eine Erhöhung der Temperatur bis auf 53<sup>0</sup> ist auf die Genauigkeit der Bestimmung ohne Einfluß, doch nimmt mit dem Anstieg der Temperatur das Schäumen der Flüssigkeit stärker zu.

<sup>3</sup> 1 Tl. Rosolsäure wird in 500 Tln. 80%igem Alkohol gelöst.

<sup>4</sup> F. A. HOPPE-SEYLER: Mikrochemie 1932, 10, 446; C. 1932, I, 2870.

<sup>5</sup> M. ST. NICHOLS u. M. E. FOOTE: Ind. engin. Chem. Analyt. Edition 1931, 3, 311; C. 1931, II, 3019.

<sup>6</sup> L. H. BAILEY: Cereal Chem. 1929, 6, 454; C. 1930, I, 411.

<sup>7</sup> E. B. R. PRIDEAUX: Journ. Soc. chem. Ind. 1929, 48, T 87; C. 1929, II, 1328.

<sup>8</sup> LEGLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1883, 16, 1333.

Nach GAILLOT<sup>1</sup> sind auf 1 g Ammoniumsulfat 5 ccm 40%ige Formaldehydlösung erforderlich.

γ) Titration in Borsäurelösung nach L. W. WINKLER<sup>2</sup>. Da die Borsäure eine so schwache Säure ist, daß ihre Lösung auf Methylorange und Kongorot nicht einwirkt, sie aber andererseits bei hinreichender Konzentration Ammoniak vollständig bindet, so kann das Ammoniak in Borsäurelösung mit Salz- oder Schwefelsäure direkt sehr scharf titriert werden.

Bei der Ammoniakdestillation, die unter Kühlung stattfinden und bei der nötigenfalls auch die Vorlage auf Zimmertemperatur gekühlt werden muß, läßt man im Anfang den Destillationsvorstoß möglichst tief in die Borsäurelösung eintauchen. Als Vorlage diene für bis zu 0,2 g Ammoniak 5 g kristallisierte Borsäure in 100 ccm Wasser. Die Titration soll mit möglichst wenig Indicator auf Gelborange, und zwar besser mit Salzsäure als mit Schwefelsäure vorgenommen werden. Man titriert mit 0,1 oder 0,25 N.-Lösung.

## 2. Ausblaseverfahren nach O. FOLIN<sup>3</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Austreibung des Ammoniaks aus der durch Alkalicarbonat oder Barytwasser alkalisch gemachten Lösung durch einen starken Luftstrom bei Zimmertemperatur. Es ist besonders geeignet für die Ammoniakbestimmung in Lösungen mit anderen, leicht zersetzlichen Stickstoffverbindungen (Harn usw.).

Nach L. GRÜNHUT<sup>4</sup> wird die Bestimmung zweckmäßig, wie folgt, ausgeführt: Die zu untersuchende Lösung bringt man in eine Drechsel-Waschflasche (Abb. 5 b) von etwa 20 ccm Höhe und etwa 5 cm Durchmesser, in deren Abführungsrohr zur Zurückhaltung etwa mechanisch mitgerissener Tröpfchen ein Wattebausch eingeschoben ist, und schließt daran als Absorptionsgefäß eine Drechsel-Waschflasche (c) an, in der sich eine Absorptionsvorrichtung nach FOLIN<sup>5</sup> (Abb. 6) befindet und die mit 0,1 N.-Schwefelsäure und erforderlichenfalls noch mit soviel Wasser beschickt ist, daß die Flüssigkeit etwa 15 mm über dem oberen Ansatz der Absorptionsvorrichtung steht. Durch diese Vorrichtung wird durch die Wasserstrahlpumpe (d) ein starker Luftstrom hindurchgesaugt, der durch Vorschalten eines Natronkalkturmes (a) und nötigenfalls — bei ammoniakhaltiger Laboratoriumsluft — einer Waschflasche mit verd. Schwefelsäure von Kohlensäure und Ammoniak befreit wird. Die Drechsel-Waschflasche mit der zu untersuchenden Lösung steht in einem Wasserbade (e) von 25°.

Nach dreistündigem Durchsaugen der Luft ist alles Ammoniak in die Vorlage übergeführt. Man nimmt dann c ab, spült das Zuleitungsrohr ab und titriert den Inhalt von c mit 0,1 N.-Natronlauge unter Verwendung von Methylorange als Indicator.

FOLIN empfiehlt zur schnelleren Austreibung des Ammoniaks, das er mit Natriumcarbonat in Freiheit setzt, einen Zusatz von 8—10 g Natriumchlorid und ferner, um das Schäumen der Destillationsflüssigkeit — namentlich bei eiweißhaltigen Lösungen — zu

<sup>1</sup> GAILLOT: Ann. Chim. analyt. appl. 1913, 18, 15.

<sup>2</sup> L. W. WINKLER: Zeitschr. angew. Chem. 1913, 26, 231; 1914, 27, 630. — Das Verfahren ist von E. BERNARD (Zeitschr. angew. Chem. 1914, 27, 664; Landw. Vers.-Stationen 1915, 86, 331), A. SCHULZE (Mitt. Landesanst. Wasserhyg. 1914, 18, 87; Z. 1916, 32, 501), F. PILZ (Zeitschr. landw. Versuchsw. Österreich 1915, 18, 55; Z. 1916, 32, 502) und L. ADLER (Zeitschr. ges. Brauwesen 1916, 39, 162; Z. 1919, 38, 293) nachgeprüft und empfohlen worden.

<sup>3</sup> O. FOLIN: Zeitschr. physiol. Chem. 1902, 37, 161. — Das Verfahren wird auch empfohlen von P. A. KOBER u. S. S. GRAVES (Journ. Amer. Chem. Soc. 1913, 35, 1594; 1916, 38, 2568; Z. 1916, 32, 183 u. 1917, 34, 166).

<sup>4</sup> L. GRÜNHUT: Z. 1919, 37, 304.

<sup>5</sup> Drechsel-Waschflaschen mit der Absorptionsvorrichtung liefert die Firma Joh. Greiner in München, Mathildenstr. 12.

verhindern, einen Zusatz von 5—10 ccm Petroleum oder Toluol. Verwendet man einen Luftstrom von 600—700 Liter in der Stunde und eine Temperatur von 20—25°, so ist nach FOLIN bei nicht zu großen Mengen Ammoniak dessen Abblasung in 1—1½ Stunden beendet. Wenn die Absorptionsvorrichtung (Abb. 6) nicht zur Verfügung steht, so kann man nach FOLIN auch zwei Absorptionsflaschen hintereinander schalten.

K. TÄUFEL und C. WAGNER<sup>1</sup> haben für das Ausblaseverfahren eine etwas abgeänderte Apparatur vorgeschlagen. Sie bringen die zu untersuchende Flüssigkeit in einen schräg gelegten 250 ccm-Rundkolben mit einem Waschflaschenaufsatz mit angeschmolzenem

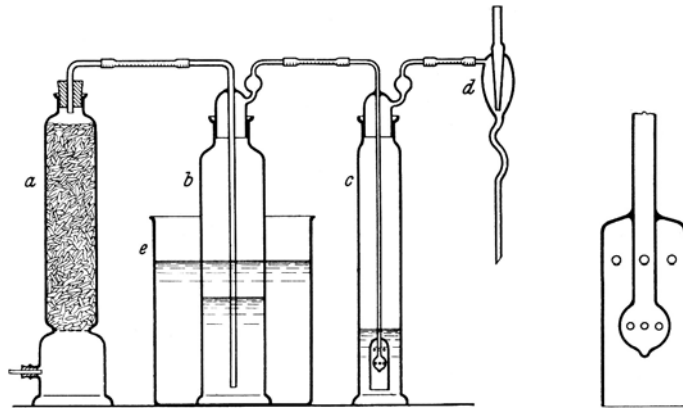


Abb. 5.

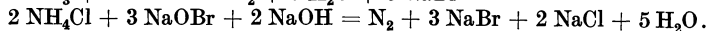
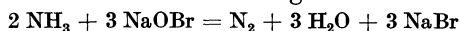
Abb. 6.

Abb. 5 u. 6. Apparat zur Ammoniakbestimmung nach FOLIN-GRÜNHUT.

REITMAYR-Aufsatz und empfehlen für die bessere Verteilung der Luft in dem Absorptionsgefäß einen sog. Jenaer Gasverteiler<sup>2</sup>. Sie haben ferner die Apparatur so eingerichtet, daß durch denselben Luftstrom mehrere Ammoniakbestimmungen gleichzeitig ausgeführt werden können.

### 3. Hypobromitverfahren.

Das Verfahren beruht auf folgender Umsetzung<sup>3</sup>:



Die Bestimmung geschieht entweder durch gasvolumetrische Messung<sup>4</sup> des Stickstoffs oder durch Ermittlung des nicht verbrauchten Hypobromits; letztere Bestimmung ist einfacher in der Ausführung und genauer.

a) Jodometrische Bestimmung nach E. RUPP und E. RÖSSLER<sup>5</sup>. Die Natriumhypobromitlauge wird hergestellt durch Auflösen von 10 g Natriumhydroxyd in 500 ccm Wasser und Zusatz von 17 g Brom<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> K. TÄUFEL u. C. WAGNER: Zeitschr. angew. Chem. 1928, 41, 285.

<sup>2</sup> P. H. PRAUSNITZ: Chem.-Ztg. 1926, 50, 809.

<sup>3</sup> Die Reaktion verläuft nach T. TEORELL (Biochem. Zeitschr. 1932, 248, 246) stöchiometrisch nur zwischen  $p_{\text{H}} = 8,5-9$ ; bei höherer Alkalität treten Abweichungen bis zu -8% ein. Vgl. auch I. M. KOLTHOFF und A. LAUR (Zeitschr. analyt. Chem. 1928, 73, 177).

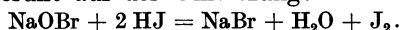
<sup>4</sup> Zu dieser Messung wurde früher das KNOP-WAGNERSCHE Azotometer verwendet. — CH. PORCHER und M. BRISAC (Bull. Soc. Chim. Paris 1902, [3] 27, 1128) sowie NICOLAS und DELAND (Ann. Chim. analyt. appl. 1905, 10, 7) haben ein dem GEISLERSCHEN Kohlensäurebestimmungsapparat ähnliches Azotometer empfohlen.

<sup>5</sup> E. RUPP u. E. RÖSSLER: Arch. Pharm. 1905, 243, 104. — Vgl. ferner P. ARTMANN u. A. SKRABAL (Zeitschr. analyt. Chem. 1907, 46, 5), P. ARTMANN (Chem.-Ztg. 1911, 35, 50) und M. B. DONALD (Analyst 1924, 49, 375; Z. 1925, 49, 56). — W. MANCHOT und F. OBERHAUSER (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1924, 57, 29) titrieren den Bromüberschuß mit Arseniger Säure zurück.

<sup>6</sup> Die Titerbeständigkeit der Lauge ist nach RUPP und RÖSSLER eine ziemlich gute, da die durch Autoxydation des Hypobromids zu Bromat entstehende Veränderung auf das Titrationsergebnis in saurer Lösung ohne Einfluß ist.



Die Bestimmung beruht auf der Umsetzung:



1 Mol  $\text{NH}_3$  ist also 3 Atomen Jod äquivalent.

Zur Ausführung der Bestimmung setzt man ein geeignetes Volumen der neutralen Ammoniaklösung in einem Stöpselglase zu einem genau abgemessenen Volumen der mit Wasser auf 50—75 ccm verdünnten Hypobromitlauge und schüttelt kräftig um. Nach 5—10 Minuten setzt man noch 50 ccm Wasser hinzu, säuert mit Salzsäure an, gibt darauf Kaliumjodid hinzu und titriert nach 2 Minuten das durch das nicht verbrauchte Hypobromit ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung zurück. Bei richtiger Ausführung der Bestimmung darf innerhalb einiger Minuten nach der Titration keine Nachbäuung der stärkehaltigen Lösung eintreten. Das Volumen der Hypobromitlauge soll so bemessen werden, daß  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  davon im Überschuß verbleibt. Der Titer der Hypobromitlauge wird durch einen in gleicher Weise ausgeführten Leerversuch festgestellt.

Nach diesem Verfahren kann man nach T. TEORELL<sup>1</sup> bis 0,02 mg Ammoniak-Stickstoff bestimmen (Fehlerbreite etwa 2%); zur Bestimmung von 0,02—0,001 mg eignet sich die

b) Titration mit Naphthylrot nach T. TEORELL<sup>1</sup>. Das Verfahren beruht auf der Titration des Hypobromitüberschusses mit Naphthylrot (Benzolazo- $\alpha$ -naphthylamin), das durch Hypobromit entfärbt wird.

Etwas vorhandene Salpetrige Säure und Ferrisalze müssen vor der Titration entfernt werden, erstere durch Oxydation mit Kaliumpermanganat, letztere durch Fällung mit Bariumcarbonat<sup>2</sup>.

Erforderliche Reagenzien. 1. 0,002 N.-Natriumhypobromitlösung, hergestellt durch Verdünnen von 20—25 ccm einer 0,1 N.-Stammlösung mit 25 ccm einer etwa 2 N.-Natriumcarbonatlösung auf 1 Liter. Sie wird in einer dunkelen Flasche aufbewahrt und erst 1 Tag nach ihrer Herstellung verwendet. Die 0,1 N.-Stammlösung wird hergestellt, indem man 5 g Natriumhydroxyd in etwa 800 ccm Wasser löst, unter Umschütteln 8 g = 2,5 ccm reinstes Brom in kleinen Portionen zusetzt und nach der Lösung des Broms auf 1 Liter auffüllt.

2. 0,0004 N.-Naphthylrotlösung. Man mischt in nachfolgender Reihenfolge 60 ccm konz. Essigsäure, 7,5 ccm Phosphorsäure (80%), 1,5 ccm konz. Salzsäure, 17 ccm einer frischbereiteten 0,1%igen Lösung von Naphthylrot<sup>3</sup> in konz. Essigsäure und füllt mit Wasser auf 1 Liter auf. Die Lösung ist, nachdem ein nach einigen Tagen bisweilen entstehender brauner Niederschlag abfiltriert ist, unbeschränkte Zeit haltbar. 2 ccm der angesäuerten 0,002 N.-Hypobromitlösung sollen etwa 10 ccm Naphthylrotlösung entfärben. Zur Bestimmung des Titers der Naphthylrotlösung dient eine Lösung von 0,04716 g Ammoniumsulfat in 1 Liter. 1 ccm davon entspricht 0,001 mg Ammoniak-Stickstoff.

3. 5%ige Bromwasserstoffsäure. 0,5 ccm dieser Säure — weniger gut Salzsäure entsprechender Stärke — entsprechen 3 ccm 0,1 N.-Natronlauge.

Ausführung der Titration: Die neutrale oder sehr schwach saure ammoniakhaltige Probe oder 5—15 ccm Destillat werden in einem 35—50 ccm Köhlbehen unter leichtem Schütteln mit genau 2,00 ccm Hypobromitlösung geschüttelt. Nach  $\frac{1}{2}$  bis einigen Minuten wird mit Bromwasserstoff angesäuert und nach einer weiteren etwa  $\frac{1}{2}$  Minute wird unter leichtem Schütteln mit der Naphthylrotlösung aus einer sehr fein ausgezogenen Bürette, die 0,01 ccm abzulesen gestattet, titriert, bis eine schwache Rosafärbung eintritt, die wenigstens 10 Sekunden bestehen bleibt.

Bei der Ausführung der Bestimmung ist Sonnenlicht fernzuhalten und neben der absoluten Reinheit der Gefäße auf möglichste Abhaltung von Staub usw. zu achten, andererseits die Titration aber auch nicht zu schnell auszuführen.

Zur Einstellung der Hypobromitlösung ist immer gleichzeitig unter den gleichen Bedingungen ein Leerversuch auszuführen. Die Fehlergrenze der Bestimmung beträgt 1—2%.

<sup>1</sup> T. TEORELL: Biochem. Zeitschr. 1932, 248, 246.

<sup>2</sup> F. ARTMANN: Chem.-Ztg. 1911, 35, 64.

<sup>3</sup> Das Naphthylrot, das vielfach als acidimetrischer Indicator verwendet wird, kann von der Firma F. C. Kahlbaum-Berlin bezogen werden.

#### 4. Colorimetrisches Verfahren mit NESSLERS Reagens.

Dieses Verfahren ist zur Bestimmung kleiner Ammoniakmengen in einem Destillat und namentlich in natürlichen Wässern geeignet.

Für diese Bestimmung ist nach L. W. WINKLER<sup>1</sup> das von ihm zum Nachweise von Ammoniak empfohlene NESSLERSche Reagens, (S. 642) nicht geeignet, sondern ein solches, das, wie folgt, bereitet wird: I. 10 g Mercurijodid werden in einem Mörser mit Wasser verrieben, in eine Flasche gespült und 5 g Kaliumjodid hinzugegeben. II. 20 g Natriumhydroxyd werden in der an 100 ccm noch fehlenden Wassermenge gelöst, die Lösung vollständig erkalten gelassen und mit I gemischt. Das Reagens wird, nachdem es sich nach einigen Tagen geklärt hat, abgossen und in einer Flasche mit paraffiniertem Korkstopfen im Dunkeln aufbewahrt.

Ausführung der Bestimmung nach L. W. WINKLER<sup>2</sup>. Erforderlich sind zwei gleiche Glasstöpselflaschen von 150 ccm Fassungsraum, in deren eine (I) man 100 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit und in die andere (II) 100 ccm ammoniakfreies destilliertes Wasser gibt. Zu beiden Flüssigkeiten werden 2—3 ccm NESSLERS Reagens tropfenweise hinzugesetzt. In die Flasche II läßt man aus einer engen Bürette langsam und so lange eine Ammoniumchloridlösung (0,315 g reinstes getrocknetes Ammoniumchlorid im Liter enthaltend), von der 1 ccm 0,1 mg Ammoniak (NH<sub>3</sub>) enthält, unter öfterem Umschwenken zufließen, bis die Gelbfärbung in beiden Flaschen gleich ist. Die für II verbrauchten Kubikzentimeter Ammoniumchloridlösung geben den Ammoniakgehalt für die Untersuchungsflüssigkeit an.

Handelt es sich um die Bestimmung des Ammoniaks in einem Erdalkalibicarbonat enthaltenden natürlichen Wasser, so setzt man vor dem NESSLERSchen Reagens 2—3 ccm Seignettesalzlösung (S. 643) hinzu.

#### 5. Sonstige Verfahren.

a) Nach SCHLÖSING<sup>3</sup>. Das zur Bestimmung von Ammoniak in Lösungen mit leicht zersetzlichen Stickstoffverbindungen empfohlene Verfahren, das Ammoniak durch Kalkmilch im Vakuumexsiccator in der Kälte auszutreiben und durch daneben gestellte titrierte Schwefelsäure absorbieren zu lassen, liefert nach CH. SCHENITZKY<sup>4</sup> meist zu niedrige Ergebnisse.

b) Nach S. S. GRAVES<sup>5</sup>. Die oben (S. 643) angegebene Reaktion auf Ammoniak kann durch Zusatz von verd. Stärkelösung als Schutzkolloid auch zu einer nephelometrischen Bestimmung des Ammoniaks verwendet werden.

c) Nach K. G. MAKRIŠ<sup>6</sup>. Das Verfahren von MAKRIŠ zum Nachweis von Ammoniak (S. 643) wurde von ihm zu einem colorimetrischen Bestimmungsverfahren ausgebaut, wobei die Farben verd. Ammoniakdestillate in 10 Röhrchen in der üblichen Weise mit denen von Verdünnungen einer Vergleichslösung, die 0,01 mg NH<sub>3</sub> je Kubikzentimeter enthält, verglichen werden. Die Färbungen wechseln zwischen Hellgelb und Rotorange.

d) Nach J. FROIDEVAUX<sup>7</sup>. Das Verfahren beruht auf der Destillation des Ammoniaks mit Lithiumcarbonat, wobei das Ammoniak schneller abdestilliert wird, als die Hydrolyse von Eiweißstoffen usw. beginnt. Der Ammoniakgehalt wird dabei durch Extrapolation rechnerisch ermittelt.

e) C. REICHARD<sup>8</sup> hat ein Verfahren angegeben, das auf der Schwerlöslichkeit des Ammoniumpikrats in Wasser, und E. RIEGLER<sup>9</sup> ein solches, das auf der Unlöslichkeit des Ammoniumtrijodats [(NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>(JO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] in verd. Alkohol und seiner Umsetzung mit Hydrazinsulfat beruht.

<sup>1</sup> L. W. WINKLER: Z. 1925, 49, 163.

<sup>2</sup> L. W. WINKLER: Chem.-Ztg. 1899, 23, 454, 541; 1901, 25, 586.

<sup>3</sup> Vgl. R. FRESENIUS: Lehrbuch der analytischen Chemie, Bd. 1, S. 225 b.

<sup>4</sup> CH. SCHENITZKY: Biochem. Zeitschr. 1916, 76, 177.

<sup>5</sup> S. S. GRAVES: Journ. Amer. Chem. Soc. 1915, 37, 1171; Z. 1921, 41, 36.

<sup>6</sup> K. G. MAKRIŠ: Zeitschr. analyt. Chem. 1931, 84, 241.

<sup>7</sup> J. FROIDEVAUX: Compt. rend. Paris 1923, 177, 1043 u. Ann. Falsif. 1924, 17, 72; Z. 1926, 52, 338 u. 1927, 53, 281.

<sup>8</sup> C. REICHARD: Chem.-Ztg. 1903, 27, 979, 1007.

<sup>9</sup> E. RIEGLER: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 677.

## V. Salpetersäure.

### A. Nachweis der Salpetersäure.

Zum Nachweise der Salpetersäure verwendet man meist die Diphenylamin- und die Brucinreaktion, doch ist bei ihrer Anwendung zu berücksichtigen, daß die Blaufärbung mit Diphenylamin-Schwefelsäure außer durch Salpetersäure auch durch Salpetrige Säure und ferner durch Chlorsäure, Unterchlorige Säure, Brom- und Jodsäure, Vanadinsäure, Chromsäure, Übermangansäure, Ferrisalze und Wasserstoffsuperoxyd verursacht werden kann<sup>1</sup>; schwächend auf die Reaktion wirken reduzierende Stoffe wie Ferrosalze, Schweflige Säure und Formaldehyd. Die Rotfärbung mit Brucin-Schwefelsäure wird außer durch Salpetersäure auch durch freies Chlor, Chlorsäure, Überchlorsäure, Perulfate usw. hervorgerufen.

Bei Gegenwart organischer Substanzen in den Lösungen werden die durch die Nitrate hervorgerufenen Färbungen häufig durch anderweitige infolge der Einwirkung der Schwefelsäure auf die organischen Substanzen hervorgerufene Färbungen verdeckt.

**1. Diphenylaminreaktion.** Die Reaktion beruht darauf, daß Diphenylamin  $[(C_6H_5)_2NH]$  in schwefelsaurer Lösung durch Nitrate zunächst in das farblose Diphenylbenzidin<sup>2</sup> übergeführt und dann zu dem violettblauen holochinoiden Imoniumsals des Diphenylbenzidins oxydiert wird; dieses kann nach H. RIEHM<sup>3</sup> mit überschüssigem Diphenylamin reagieren und gibt dann ein Chinhydronsalz von olivgrüner Farbe. Zur Vermeidung letzterer Bildung darf das Reagens nicht zu reich an Diphenylamin sein<sup>3</sup>.

Diphenylaminreagens nach J. TILLMANS<sup>4</sup>. 0,085 g Diphenylamin werden in einem 500 ccm-Kolben mit 190 ccm verd. Schwefelsäure (1 + 3) versetzt. Darauf wird konz. Schwefelsäure (d = 1,84) zugegeben und umgeschüttelt, wobei das Diphenylamin sich löst. Man füllt mit konz. Schwefelsäure fast bis zur Marke auf, kühlt ab, und mischt<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Löst man das Diphenylamin nicht in Schwefelsäure, sondern in Salzsäure oder Essigsäure, so soll nach C. H. HINRICHS (Bull. Soc. Chim. Paris 1905, **93**, 1002; Z. 1907, **13**, 29) die Reaktion mit Nitraten schon in der Kälte eintreten, während die Reaktionen mit den übrigen Verbindungen erst beim Erwärmen auf mindestens 50° eintreten.

<sup>2</sup> Das Diphenylbenzidin, welches F. KEHRMANN und St. MICEWICZ (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1912, **45**, 2641), sowie H. WIELAND (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1913, **46**, 3296) als Zwischenverbindung der Reaktion nachgewiesen haben, ist von MARQUEYROL und H. MURAUOUR (Bull. Soc. chim. France 1914, [4] **15**, 186; C. 1914, I, 1427) sowie von E. A. LETTS und F. W. RËA (Journ. Chem. Soc. London 1914, **105**, 1157; C. 1914, II, 263) zum Nachweis und zur Bestimmung der Salpetersäure vorgeschlagen. Es ist ungefähr doppelt so empfindlich wie Diphenylamin. L. SMITH (Zeitschr. analyt. Chem. 1917, **56**, 28) bestätigt diese Angabe. — H. RIEHM (Zeitschr. analyt. Chem. 1930, **81**, 439) weist darauf hin, daß es sich bei der Diphenylbenzidinreaktion um dieselbe chemische Reaktion wie bei der Diphenylaminreaktion handelt, daß die letztere aber sich als praktisch brauchbarer erweist. Nur in Fällen, wo eine erhöhte Empfindlichkeit und eine größere Reaktionsgeschwindigkeit wünschenswert ist, ist Diphenylbenzidin vorzuziehen. M. WHELAN (Journ. Biol. Chem. 1930, **86**, 189; C. 1930, I, 3705) empfiehlt daher die Reaktion mit Diphenylbenzidin zum Nachweise und zur Bestimmung geringer Mengen von Nitraten und Nitriten in biologischen Flüssigkeiten.

MARQUEYROL und MURAUOUR geben ein Verfahren zur Darstellung des Diphenylbenzidins an.

<sup>3</sup> H. RIEHM: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, **81**, 353, 439.

<sup>4</sup> J. TILLMANS: Z. 1910, **20**, 690. — Nach L. EKKERT (Pharm. Zentralh. 1925, **66**, 649) soll die Reaktion noch empfindlicher sein, wenn man Phosphorsäure statt Schwefelsäure verwendet.

<sup>5</sup> Da die meiste konzentrierte Schwefelsäure des Handels etwas Salpetersäure enthält, zeigt das Reagens vielfach geringe Blaufärbung; in diesem Falle erhitzt man das Reagens nach W. TÖNTUS (Z. 1916, **31**, 322) auf 110° oder nach H. RIEHM auf 160°, bis die Blaufärbung verschwunden ist. Statt dessen kann man auch nach A. SCHWICKER (Z. 1916, **32**, 129) die konz. Schwefelsäure vorher mit 4—5 g Natriumchlorid oder nach H. RIEHM (Zeitschr. analyt. Chem. 1930, **81**, 353 u. 439) besser mit 5 g Kaliumchlorid je Liter 15 Minuten kochen.

**Ausführung der Reaktion.** 4 ccm Reagens schüttelt man in einem Reagenrohr mit 1 ccm der auf Salpetersäure zu prüfenden, mit 1 Tropfen Salzsäure oder mit 1—2 Tropfen kaltgesättigter Natriumchloridlösung oder einem Körnchen Natriumchlorid (salpetersäurefrei) versetzten Flüssigkeit und kühlt sofort ab. Je nach dem Salpetersäuregehalt tritt sofort oder spätestens nach 1 Stunde eine mehr oder weniger starke Blaufärbung ein. Auf diese Weise ist noch 0,1 mg Salpetersäure im Liter Wasser nachweisbar, während ohne Zusatz von Natriumchlorid<sup>1</sup> die Reaktion wesentlich weniger empfindlich ist. Durch Erwärmung wird die Reaktion begünstigt.

Nach J. TILLMANS<sup>2</sup> tritt bei Abwesenheit von Choriden in der Lösung die Diphenylaminreaktion mit Salpetersäure überhaupt nicht ein, wohl aber mit Salpetriger Säure<sup>3</sup>; auf die Stärke ihrer Reaktion ist ein Chloridgehalt der Lösung ohne jeglichen Einfluß. Die Blaufärbung tritt sehr schnell ein, verschwindet aber nach 1 Stunde allmählich wieder.

Soll die Reaktion auf Salpetersäure neben Salpetriger Säure ausgeführt werden, so kann man die letztere entweder nach K. B. LEHMANN durch Stehenlassen (14 Stunden) von 100 ccm Wasser mit 0,2 g Harnstoff und 5 Tropfen Schwefelsäure [ $2 \text{HNO}_3 + \text{CO}(\text{NH}_2)_2 = \text{CO}_2 + 2 \text{N}_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$ ] oder durch Eindampfen von 100 ccm Wasser mit 5 ccm 10%iger Ammoniumchloridlösung auf dem Wasserbade auf 25 ccm [ $\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl} = \text{NaCl} + \text{N}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ] als Stickstoff entfernen. Salpetersäure wird hierbei nicht angegriffen<sup>3</sup>.

**2. Brucinreaktion.** Brucin, in konz. Schwefelsäure gelöst, gibt mit Salpetersäure eine blaßrosa bis kirschrote Färbung, die alsbald in Gelb umschlägt.

Nach L. W. WINKLER<sup>4</sup> stellt man das immer frisch zu bereitende Brucinreagens durch Lösen von 0,5 g Brucin in 200 ccm konz. Schwefelsäure her und führt die Reaktion, z. B. bei der Untersuchung von Wasser, in der Weise aus, daß man 1 ccm Wasser mit 2 ccm Brucinreagens vermischt. Bei Gegenwart von 1 mg  $\text{N}_2\text{O}_5$  im Liter tritt noch eine blaßrosa Färbung ein. Die zu verwendende Schwefelsäure muß frei von Salpetersäure<sup>5</sup> und das Brucin rein weiß sein.

Mit Salpetriger Säure tritt keine Reaktion ein, wenn man den Nachweis in der vorstehenden Weise ausführt, da die Salpetrige Säure dabei in Nitrosylschwefelsäure übergeführt wird. Wenn man dagegen zu 1 ccm Wasser nur 0,3 ccm Schwefelsäure gibt, und in der vollständig erkalteten, nicht zu viel Salpetersäure enthaltenden Flüssigkeit etwas Brucin löst, so reagiert nur die Salpetrige Säure.

**3. Nitronreaktion.** Die Nitronreaktion (S. 658) kann nach M. BUSCH<sup>6</sup> auch zum Nachweise von Salpetersäure verwendet werden: Man versetzt 1 ccm der zu prüfenden Lösung mit 5—6 Tropfen 10%iger Nitronacetatlösung. Bei 0,03 mg  $\text{HNO}_3$  in 1 ccm tritt sofort, bei 0,015 mg nach 2 Stunden und bei 0,0075 mg nach 5 Stunden eine deutliche Ausscheidung von Nitronnitrat ein.

**4. Sonstige Reaktionen.** Außer den vorstehenden Verfahren und der bekannten Ringreaktion mit Ferrosulfat und konz. Schwefelsäure sind unter anderen noch folgende Reaktionen zum Nachweise von Salpetersäure vorgeschlagen worden:

<sup>1</sup> Auf die Steigerung der Empfindlichkeit der Reaktion durch den Zusatz von Natriumchlorid bzw. von Salzsäure hat zuerst R. CIMMINO (Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 429) hingewiesen. Die Wirkung der Salzsäure hierbei erläutert H. RIEHM (Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 81, 353); es entstehen bei der Einwirkung von Salpetersäure auf die Salzsäure Nitrosylchlorid (NOCl) und freies Chlor, die eine stärkere Oxydationswirkung herbeiführen als die Salpetersäure; andererseits ist die Salpetrige Säure in ihrer Oxydationswirkung stärker als die Salpetersäure, so daß bei ihr ein Zusatz von Salzsäure nicht erforderlich ist.

<sup>2</sup> J. TILLMANS: Z. 1910, 20, 679. — Dasselbst findet sich auch eine Zusammenstellung der älteren Literatur über die Diphenylaminreaktion.

<sup>3</sup> J. TILLMANS u. W. SUTTHOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1911, 50, 473.

<sup>4</sup> L. W. WINKLER in LUNGE-BERL: Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, 8. Aufl., Bd. II, 1. Berlin: Julius Springer 1932.

<sup>5</sup> Vgl. Anmerkung 5, S. 650.

<sup>6</sup> M. BUSCH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 4055.

a) Überführung in Salpetrige Säure. L. v. LIEBERMANN und D. ACÉL<sup>1</sup> reduzieren die Salpetersäure durch Zink und Essigsäure und weisen die dadurch gebildete Salpetrige Säure mit dem Sulfanilsäure-Naphthylaminreagens (S. 661) nach. Ist in der Lösung Salpetrige Säure vorhanden, so wird diese vorher nach K. B. LEHMANN durch Zusatz von Harnstoff (0,5 g Harnstoff und 1 ccm starke Essigsäure auf 20 ccm) und 5 Minuten langes Erhitzen zerstört. — F. L. HAHN u. G. JAEGER<sup>2</sup> reduzieren Nitrate in wäßriger Lösung mit metallischem Blei in Gegenwart von Bleisalz zu Nitriten und weisen diese ebenfalls mit dem Sulfanilsäure-Naphthylaminreagens nach.

b) J. SCHMIDT und H. LUMPP<sup>3</sup> verwenden zum Nachweise von Salpetersäure Substitutionsprodukte des Diphenanthrylamins in konz. Schwefelsäure, insbesondere das Dimonoxy-phenanthrylamin. Geringe Mengen Salpetrige Säure stören die Reaktion nicht.

c) H. WOLF und E. HEYMANN<sup>4</sup> empfehlen 2,4-Diamino-6-oxypyrimidin. Salpetrige Säure stört die Reaktion nicht.

d) G. BINI<sup>5</sup> schlägt Hydrochinon-sulfonsäure als Reagens vor; dieses gibt mit Nitraten eine grüne Färbung. Empfindlichkeit 0,01 mg/l; Nitrite bis 0,2 mg/l stören die Reaktion nicht.

e) L. DESVERGNES<sup>6</sup> beschreibt eine Reaktion mit Diäthyl-diphenyl-harnstoff.

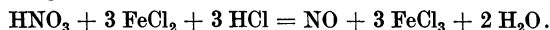
## B. Bestimmung der Salpetersäure.

Die in den Lebensmitteln vorkommenden Verbindungen der Salpetersäure sind sämtlich in Wasser leicht löslich. Sofern keine wäßrigen Lösungen vorliegen, kann man daher solche leicht durch Ausziehen mit Wasser herstellen.

Von den zur Bestimmung der Salpetersäure vorgeschlagenen Verfahren ist das älteste, das von SCHLÖSING, welches auf der Überführung der Salpetersäure in Stickoxyd (NO) durch Eisenchlorür und konz. Salzsäure beruht, in allen Fällen, auch bei Gegenwart organischer Stickstoffverbindungen und Ammoniak, anwendbar. Das gleiche ist der Fall bei dem Nitronverfahren von M. BUSCH. Einfacher in der Ausführung sind die Verfahren, welche auf der Überführung der Salpetersäure in Ammoniak in saurer (ULSCH) oder alkalischer Lösung (KÖNIG-BÖTTCHER) beruhen. Sie empfehlen sich in erster Linie für Substanzen, die keine nennenswerten Mengen organischer Stickstoffverbindungen enthalten (Konservierungssalze, Wasser).

### 1. Überführung in Stickoxyd<sup>7</sup>.

Die Überführung erfolgt nach der Gleichung:



a) Gasanalytische Bestimmung nach SCHLÖSING<sup>8</sup>. Die salpeterhaltige Flüssigkeit (z. B. Fleisch- oder Pflanzenauszug) wird unter Zusatz einer genügenden Menge Calciumoxyd auf ein kleines Volumen eingedampft, filtriert und entweder das ganze Filtrat oder ein aliquoter Teil davon in folgender Weise zur Bestimmung verwendet:

In den Kochkolben A (Abb. 7) von 250—300 ccm Fassung, welcher durch einen doppelt durchbohrten Gummistopfen geschlossen ist, reicht ein 15 ccm fassendes Trichterrohr (B) mit Glashahn. Das untere, eng ausgezogene Ende dieses Rohres reicht bis in den Bauch des Kochkolbens, jedoch nicht bis in die Flüssigkeit. Durch die zweite Öffnung des Stopfens

<sup>1</sup> L. v. LIEBERMANN u. D. ACÉL: Hygien. Rundschau 1915, 25, 805; C. 1916, I, 266. — Vgl. auch D. ACÉL: Z. 1916, 31, 332; J. BLOM: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, 59, 121.

<sup>2</sup> F. L. HAHN u. G. JAEGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1925, 58, 2335.

<sup>3</sup> J. SCHMIDT u. H. LUMPP: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, 43, 794.

<sup>4</sup> H. WOLF u. E. HEYMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1924, 37, 195.

<sup>5</sup> G. BINI: Atti R. Accad. Lincei (Roma), Rend. 1930, (6) 11, 593; C. 1930, II, 1111.

<sup>6</sup> L. DESVERGNES: Ann. Chim. analyt. appl. 1924, (2) 6, 102; C. 1925, I, 2250.

<sup>7</sup> Das Verfahren ist nach O. RUFF und E. GERSTEN (Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1911, 71, 419) bei Gegenwart von Arseniten und Sulfiden nicht verwendbar.

<sup>8</sup> TH. SCHLÖSING: Journ. prakt. Chem. 1854, 62, 142.

geht ein Gasableitungsrohr *C* bis in die mit 10—20%iger Natronlauge beschickte Glaswanne mit dem 100 ccm fassenden, in 0,1 ccm eingeteilten Eudiometerrohr *D*.

In den Kolben *A* gibt man 40 ccm etwa 20%ige Eisenchlorürlösung und ebensoviel 20%ige Salzsäure. Man vertreibt nun durch anhaltendes Kochen und mit der Vorsicht, daß das Trichterrohr *B* stets etwas Salzsäure enthält, die atmosphärische Luft aus dem Apparat. Sodann bringt man eines der Eudiometer über das Gasleitungsrohr und in das Trichterrohr die wäßrige salpetersäurehaltige Lösung. Der Glashahn wird alsdann so gestellt, daß die Lösung langsam in die siedende Eisenchlorürlösung tropft. Ist dies bis auf einen kleinen Rest geschehen, so wird das Trichterrohr zweimal mit 10%iger Salzsäure nachgespült und die Säure in gleicher Weise wie die Substanz tropfenweise in die siedende Eisenlösung gebracht. Findet keine Entbindung von Stickoxydgas mehr statt, so ist die Zersetzung beendet. Man schiebt alsdann, während man

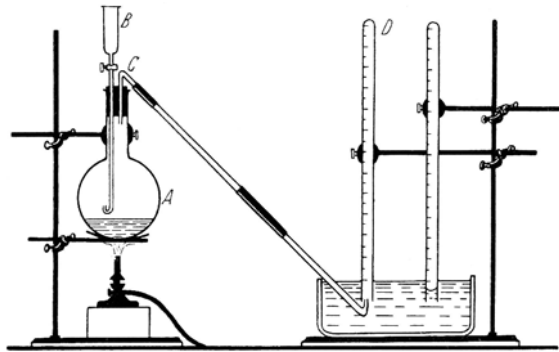


Abb. 7. Vorrichtung zur Bestimmung des Salpeter-Stickstoffs nach SCHLÖSING.

den Inhalt des Kölbchens stets im Sieden erhält, das Eudiometer vorläufig zur Seite, ersetzt es durch ein anderes und bringt 10 ccm einer N.-Salpeterlösung, welche im Liter genau 33 g chemisch reines Natriumnitrat oder entsprechende Mengen Kaliumnitrat enthält, in das Trichterrohr, indem man im übrigen ganz so verfährt wie zuvor, besonders auch zweimal mit Salzsäure nachspült. Man kann so, ohne die Eisenlösung zu erschöpfen, noch 6—7 weitere Bestimmungen entweder von anderen Lösungen oder zur Kontrolle folgen lassen. Ist diese beendet, so öffnet man den Glashahn an *B*, um Luft in das Kölbchen eintreten zu lassen und entfernt die Flamme. Die das Stickoxyd enthaltenden Meßröhren hat man inzwischen in einen hohen weiten Glaszylinder mit Wasser gesenkt, in welchem sie durch Klammern festgehalten werden. Man bringt das Wasser in und außerhalb der Röhre auf gleiches Niveau, und wenn die Temperatur aller Meßröhren und ihres Inhaltes die gleiche ist, liest man das Gasvolumen ab.

Durch die gleichzeitige, vergleichsweise ausgeführte Stickoxydbestimmung einer Salpeterlösung von bekanntem Gehalt umgeht man die sonst erforderlichen Umrechnungen.

Beispiel. Angenommen, die zu untersuchende Salpeterlösung habe 8,1 ccm Stickoxyd geliefert, die 10 ccm der N.-Salpeterlösung, 0,33 g  $\text{NaNO}_3$  enthaltend, dagegen 89,5 ccm, so entspricht, da  $0,33 \text{ g NaNO}_3 = \frac{0,33 \times 14}{85} = 0,33 \times 0,1647 = 0,05435 \text{ g N}$  enthalten,

1 ccm Stickoxydgas  $\frac{0,05435}{89,5} = 0,000607 \text{ g}$ , also die für die Untersuchungslösung gefundenen 8,1 ccm  $= 0,000607 \times 8,1 = 0,00492 \text{ g N} = 0,01897 \text{ g N}_2\text{O}_5$ <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> P. LIECHTI und E. RITTER (Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 205; 1904, 43, 168) fanden im Gegensatz zu TH. PFEIFFER und H. THURMANN (Landw. Vers.-Stationen 1896, 46, 1) und TH. PFEIFFER (Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 612) bei einer eingehenden Nachprüfung des SCHLÖSING'schen Verfahrens in Übereinstimmung mit zahlreichen älteren Arbeiten, daß die gefundenen Werte für Nitratstickstoff durch die Gegenwart größerer Mengen Ammoniumsulfat etwa 1% und von Harnstoff etwa 1,9% (in Prozent des Nitratstickstoffs) niedriger ausfallen als bei reinen Salpeterlösungen.

Es empfiehlt sich als Absperrmittel Natronlauge anstatt des von SCHLÖSING und anderen angewandten Quecksilbers zu verwenden, um die aus in der Lösung etwa vorhandenen Carbonaten gelieferte oder durch Zersetzung von Pektinen entstandene Kohlensäure (vgl. TH. ANDREADIS: Biochem. Zeitschr. 1929, 204, 484) zu absorbieren. Gegen die Anwendung von Natronlauge sind zwar Bedenken geäußert, weil durch sauerstoffhaltige Natronlauge Stickoxyd zu Salpetersäure oxydiert werden kann, nach W. STÜBER<sup>1</sup> können diese Fehler aber vermieden werden, wenn man als Sperrflüssigkeit eine etwa 20%ige,  $\frac{1}{4}$  Stunde gekochte und schnell auf 45° abgekühlte Natronlauge verwendet und zum Auffangen des Stickoxydes sich eines 2—3mal mit ausgekochtem Wasser ausgespülten Azotometers (S. 580) bedient, in das die noch warme Natronlauge eingefüllt wird.

W. STÜBER verwendet zur Zersetzung einen 150 ccm-Kolben aus Jenaer Glas und zum Auffangen des Stickoxyds ein Azotometer (S. 580) mit wie oben angegeben gekochter Natronlauge. In den Zersetzungskolben gibt man je 40 ccm gesättigter Eisenchlorürlösung und 20%iger Salzsäure und verfährt im übrigen wie oben beschrieben. Nachdem die Stickoxydentwicklung beendet ist, läßt man das Azotometer 1 bis 2 Stunden in einem Raum mit möglichst konstanter Temperatur stehen, stellt durch das seitliche Glasgefäß ein gleich hohes Niveau her und berechnet aus dem abgelesenen Gasvolumen nach S. 581 die Stickoxydmenge.

Statt dieser Art der Berechnung kann man sich auch wie oben des Vergleiches mit einer unter den gleichen Bedingungen zersetzten bekannten Salpetermenge bedienen.

L. SPIEGEL<sup>2</sup> und auch W. STRECKER<sup>3</sup> haben empfohlen, anstatt die Luft aus dem Apparat von SCHLÖSING durch Kochen der Lösung in dem Zersetzungskolben auszutreiben, dies durch luftfreie Kohlensäure zu tun und auch während der Bestimmung das Stickoxyd durch Kohlensäure in das Eudiometer überzuführen.

L. SPIEGEL bedient sich dabei nebenstehender Vorrichtung (Abb. 8). Man beschickt den 150 ccm-Kolben *A* mit der zu untersuchenden Nitratlösung, leitet durch das Rohr *B*, das bei *a* in das oben zu der 50 ccm-Kugel *D* erweiteret, etwa 2 cm über dem Boden von *A* endende Rohr *C* eingeschlif-

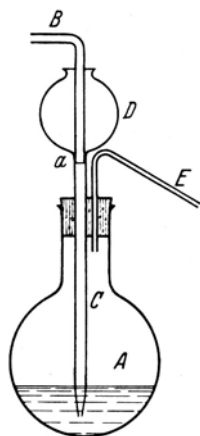


Abb. 8. Zersetzungs-  
vorrichtung nach  
L. SPIEGEL.

ist, luftfreie Kohlensäure ein und erhitzt die Nitratlösung zu mäßigem Sieden, bis das durch *E* entweichende Gas luftfrei ist. Darauf wird das mit Natronlauge gefüllte Eudiometer über das mit *E* verbundene Gasentbindungsendstück gestülpt. Dann werden in *D* 20 ccm frisch bereitete und ausgekochte Eisenchlorürlösung gebracht und durch Lüftung von *B* zufließen gelassen und 40 ccm ausgekochte konz. Salzsäure nachgeschickt. Sobald die Flüssigkeit in *A* wieder ins Sieden gelangt ist, wird der Kohlensäurestrom abgestellt und erst gegen Ende der Bestimmung, wenn der Kolbeninhalt fest zu werden beginnt, wieder angestellt, bis alles Stickoxyd in das Eudiometer übergetrieben ist.

b) Gewichtsanalytische Bestimmung nach C. BÖHMER<sup>4</sup>. Das Verfahren beruht auf der Oxydation des Stickoxyds zu Salpetersäure mittels Chromsäure. Zur Ausführung der Bestimmung dient die in Abb. 9 dargestellte Vorrichtung<sup>5</sup>.

An den Kolben *A* zur Überführung der Salpetersäure in Stickoxyd schließt sich das in kaltes Wasser getauchte U-Rohr *B*, welches mit Glasperlen und 5—10 ccm Natriumcarbonatlösung gefüllt ist und zusammen mit dem Chlorcalciumrohre *C* zur Zurückhaltung des aus

<sup>1</sup> W. STÜBER: Z. 1905, 10, 329.

<sup>2</sup> L. SPIEGEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1890, 23, 1361.

<sup>3</sup> W. STRECKER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1918, 51, 997.

<sup>4</sup> C. BÖHMER: Landw. Vers.-Stationen 1883, 29, 247.

<sup>5</sup> Nach D. N. PRJANISCHNIKOW u. A. A. SCHMUCK: In G. KLEINs Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 2, S. 82. Berlin: Julius Springer 1932.

*A* entweichenden salzsäurehaltigen Wassers und zum Trocknen des Stickoxydgases dient. An *C* schließt sich ein Absorptionsapparat *D* an, der 10—15 cem 12%iger Salpetersäure enthält, in der 12 g Chromsäure gelöst sind; an *D* schließt sich ein Chlorcalciumrohr *E* zur Zurückhaltung des aus *D* entweichenden Wassers an. *D* und *E* werden vor der Bestimmung gewogen. Der im übrigen wie bei der Bestimmung nach a) eingerichtete Zersetzungskolben *A* enthält außerdem noch ein durch einen Schraubenquetschhahn verschließbares Rohr, durch welches Kohlensäure durch den Apparat geleitet werden kann.

**Ausführung der Bestimmung.** Die salpetersäurehaltige Lösung wird in den Kolben *A* gebracht und darauf durch den Apparat ein Kohlensäurestrom geleitet, bis die Luft völlig aus dem Apparat verdrängt ist, worauf durch den Tropftrichter in den Kolben *A* ein Gemisch von gleichen Teilen 20%iger Eisenchlorürlösung und 20%iger Salzsäure gegeben wird. Darauf wird der Kohlensäurestrom bis zu einem sehr schwachen Zufluß abgestellt und der Inhalt des Kolbens *A* zum Sieden erhitzt. Sobald die Umsetzung der

Salpetersäure beendet ist, stellt man das Erhitzen ein, leitet noch einige Zeit Kohlensäure durch den Apparat und saugt darauf nach Abstellung des Kohlensäurestromes etwa 5 Minuten lang Luft durch den Apparat. Darauf wird die Gewichtszunahme von *D* und *E* festgestellt. Die Gewichtszunahme, mit 1,8 multipliziert ( $60 \text{ N}_2\text{O}_2 : 108 \text{ N}_2\text{O}_5$ ), ergibt die in der untersuchten Lösung vorhandene Menge Salpetersäure.

c) An sonstigen Verfahren, die auf der Überführung der Salpetersäure in Stickoxyd beruhen, sind noch folgende vorgeschlagen:

H. N. MORSE und A. F. LINN<sup>1</sup> sowie B. PFYL<sup>2</sup> oxydieren das Stickoxyd mit Kaliumpermanganat zu Salpetersäure und titrieren die nicht verbrauchte Menge Permanganat mit Ferrosulfatlösung. — L. DEBOURDEAUX<sup>3</sup> erhitzt die Salpeterlösung mit einer gemessenen Menge Oxalsäure und Schwefelsäure bei Gegenwart von Mangansulfat und titriert die nicht verbrauchte Oxalsäure mit Kaliumpermanganatlösung zurück. — G. RIVIERE und G. PICHARD<sup>4</sup> zersetzen die Salpeterlösung durch Erhitzen mit einer gemessenen Menge Ferrosulfat bis zum Verschwinden der braunen Farbe und titrieren den Überschuß an Ferrosulfat mit Kaliumpermanganatlösung. — J. GOLSE<sup>5</sup> führt die Reaktion mit einer gemessenen Menge von MOHR'schem Salz und Schwefelsäure aus und titriert den Überschuß an MOHR'schem Salz mit Kaliumpermanganat. Die Luft wird dabei aus dem Apparat mit darin aus Natriumbicarbonat erzeugter Kohlensäure verdrängt. Ähnlich verfahren P. GRIGORGEFF u. E. NASTASKINA<sup>6</sup>.

## 2. Überführung in Ammoniak.

Die Überführung der Salpetersäure — auch der Salpetrigen Säure — in Ammoniak kann sowohl in saurer Lösung mit Eisen und Schwefelsäure oder mit Zinnchlorür, Zinkstaub und Salzsäure, als auch in alkalischer Lösung mit

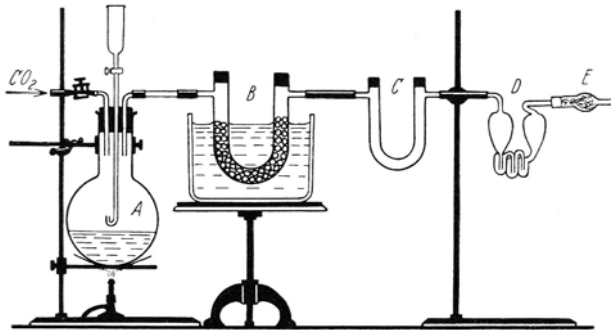


Abb. 9. Vorrichtung zur Gewichtsbestimmung des Stickoxyds.

<sup>1</sup> H. N. MORSE u. A. F. LINN: Amer. chem. Journ. 1886, 8, 274; C. 1887, 96.

<sup>2</sup> B. PFYL: Z. 1905, 10, 101.

<sup>3</sup> L. DEBOURDEAUX: Bull. Sciences Pharmacol. 1903, 5, 278, 358; Bull. Soc. Chim. Paris 1904, 31, 3—6; Z. 1904, 7, 626; 8, 359; 1905, 9, 26.

<sup>4</sup> G. RIVIERE u. G. PICHARD: Bull. Soc. chim. France 1925, (4) 37, 1674; C. 1926, I, 2219.

<sup>5</sup> J. GOLSE: Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 1929, 67, 8; C. 1929, II, 73.

<sup>6</sup> P. GRIGORGEFF u. E. NASTASKINA: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 93, 105.



Zink- und Eisenstaub oder DEVARDascher oder ARNDScher Legierung und ferner auch durch den elektrischen Strom erfolgen; am einfachsten ist das Verfahren von ULSCH.

Das gebildete Ammoniak bestimmt man nach den oben (S. 643) beschriebenen Methoden.

a) **Reduktion in schwefelsaurer Lösung nach K. ULSCH<sup>1</sup>.** In einen 0,5 l-Rundkolben mit flachem Boden bringt man 25 ccm der wäßrigen Nitratlösung, welche höchstens 0,5 g Kaliumnitrat oder die äquivalente Menge eines anderen salpetersauren Salzes enthält, setzt 10 ccm verd. Schwefelsäure von 1,35 Spez. Gewicht (erhalten durch Mischen von ungefähr 2 Volumen Wasser mit 1 Volumen konz. Schwefelsäure) und ferner 5 g des käuflichen Eisenpulvers (Ferrum hydrogenio reductum) hinzu. Um Verluste durch Verspritzen zu vermeiden, hängt man in den Hals des Kolbens ein spitz ausgezogenes, birnenförmiges, oben offenes Glasgefäß von 25 ccm Inhalt und füllt dieses mit kaltem Wasser, so daß es als Rückflußkühler dient. Durch vorsichtiges Erwärmen mit sehr kleiner Flamme unterhält man eine lebhaft, doch nicht zu stürmische Wasserstoffentwicklung und steigert die Hitze in dem Maße, wie die Reaktion schwächer wird, so daß nach etwa 4 Minuten, vom Beginn des Erwärmens an gerechnet, die Flüssigkeit unter noch andauernder Gasentwicklung zu sieden beginnt. Nachdem man etwa eine halbe Minute im schwachen Sieden erhalten hat, ist die Reduktion beendet. Man verdünnt alsdann mit 50 ccm Wasser, übersättigt mit 20 ccm Natronlauge von 1,35 Spez. Gewicht, destilliert das Ammoniak in titrierte Schwefelsäure ab und mißt deren Überschuß oder verfährt nach einem anderen der oben (S. 645) beschriebenen Verfahren.

Da das gesamte Flüssigkeitsvolumen sehr gering ist, so wird alles Ammoniak durch etwa 5—7 Minuten dauerndes lebhaftes Kochen ausgetrieben.

E. POZZI-ESCOT<sup>2</sup> verwendet statt Eisenpulver Aluminiumschnitzel, die bei Gegenwart von Quecksilber als Katalysator schon in der Kälte reduzieren.

K. KÜRSCHNER u. K. SCHARRER<sup>3</sup> empfehlen, statt des Eisenpulvers 3,5 g zusammengerollten Blumendraht, 0,5 g Kupferoxyd und ferner 30 ccm Schwefelsäure (1 + 2 Vol.) zu verwenden, das Gemisch eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen zu lassen und dann 1/2 Stunde zu erwärmen.

Die Reduktion kann auch nach M. KRÜGER<sup>4</sup> in salzsaurer Lösung mittels Zinnchlorür und Zinnschaum oder Zink erfolgen.

b) **Reduktion in alkalischer Lösung.** Für diese Reduktion ist eine Reihe von Vorschlägen gemacht, bei denen sowohl das Reduktionsmittel als auch die Lauge mehr oder weniger verschieden sind; die wichtigsten s. Tabelle 3.

Die Ausführung der Bestimmung ist bei allen diesen Verfahren im allgemeinen eine ähnliche: 50—100 ccm der Salpeterlösung werden in einem 400 bis 500 ccm-Kolben mit entsprechenden Wassermengen versetzt, dazu gibt man das Reduktionsmittel, die sonstigen Zusätze und das Destillationsmittel. Als Vorlage dient ein PELIGOT-Rohr oder ein ERLLENMEYER-Kolben mit dem Bindemittel für das Ammoniak und destilliert unter Verwendung eines Sicherheitsaufsatzes unter Kühlung, z. B. in dem Apparat Abb. 11 auf S. 578, das entstandene Ammoniak ab, das nach den S. 643 beschriebenen Verfahren bestimmt wird.

Das Verfahren von TH. ARND, das in sehr schwach durch Magnesiumhydroxyd alkalischer Lösung arbeitet und sehr gute Ergebnisse liefert, wird, wie folgt, ausgeführt:

Zu der in dem Destillationskolben befindlichen, bis zu 0,1 g Nitratstickstoff enthaltenden Lösung (250—300 ccm) setzt man 50 ccm einer 20%igen Lösung

<sup>1</sup> K. ULSCH: C. 1890, II, 926.

<sup>2</sup> E. POZZI-ESCOT: Ann. Chim. analyt. appl. 1909, 14, 445; Z. 1910, 20, 719.

<sup>3</sup> K. KÜRSCHNER u. K. SCHARRER: Chem.-Ztg. 1925, 49, 1077.

<sup>4</sup> M. KRÜGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, 27, 609, 1633. — Vgl. dazu auch P. SZEBERÉNYI: Zeitschr. analyt. Chem. 1932, 87, 357.

von kryst. Magnesiumchlorid und 5 g — bis 0,05 g Stickstoff genügen 3 g — feingepulverte Kupfer-Magnesium-Legierung zu. Durch sofortiges Erhitzen mit voller Flamme werden 200—250 ccm der Lösung abdestilliert und das übertriebene Ammoniak in titrierter Säure aufgefangen und nach einem der S. 643 beschriebenen Verfahren bestimmt.

Zu beachten ist, daß die Methode bei Gegenwart von freiem Alkali versagt, weil die Reduktion dadurch völlig aufgehoben wird.

Tabelle 3. Reduktions- und Destillationsmittel für Nitrate.

| Verfahren von   | Reduktionsmittel   | Sonstige Zusätze   | Destillationsmittel                                     |
|---|--|--|---|
| J. KÖNIG <sup>1</sup>   | Je 8—10 g Zink- und Eisenstaub                                 | 75 ccm Alkohol   | 18—20 g Kalihydrat                                      |
| O. BÖTTCHER <sup>2</sup>  | 5 g Zinkstaub + 5 g Eisenpulver (Ferrum limatum)               | —  | 80 ccm Natronlauge ( $d^{15^{\circ}} = 1,3$ )           |
| A. STUTZER  | 3 g Aluminium-Draht oder -Blech                                | —  | 25 ccm Natronlauge ( $d^{15^{\circ}} = 1,3$ )           |
| A. DEVARDA <sup>3</sup> (für 0,1 g N)   | 2—2,5 g Legierung von 50% Cu, 45% Al, 5% Zn                    | 5 ccm Alkohol  | 50 ccm Kalilauge ( $d^{15^{\circ}} = 1,3$ )             |
| TH. ARND <sup>4</sup> (für 0,1 g N)   | 5 g Legierung von 60% Cu, 40% Mg <sup>8</sup>                  | 5 ccm 20%ige MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O-Lösung  | Magnesiumhydroxyd                                       |
| F. M. SCALES <sup>5</sup>   | Zink-Kupferpaar, bereitet aus Zn mit saurer Kupfersulfatlösung | 5 g NaCl   | 1 g Magnesiumoxyd                                       |
| C. J. VAN NIEUWENBURG und G. P. DE GROOT <sup>6</sup> (für 0,3 g KNO <sub>3</sub> ) | 2 g Aluminiumspäne (nicht Pulver)                              | 5 ccm 10%iger CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O-Lösung | 5—25 ccm 20%iger Natronlauge                            |
| A. SEYEWETZ und SALQUE <sup>7</sup> (für 1 g KNO <sub>3</sub> )                     | 10 g feinstes mattgraues (nicht glänzendes) Aluminiumpulver    | —  | 25 ccm Natriumcarbonatlösung ( $d^{15^{\circ}} = 1,3$ ) |

c) Reduktion durch Elektrolyse. Dieses zuerst von VORTMANN<sup>9</sup> vorgeschlagene Verfahren beruht auf der Reduktion bei Gegenwart von Kupfersulfat und freier Schwefelsäure und der Bestimmung des Ammoniaks durch Destillation mit Alkali oder Messung der Säureabnahme infolge der Ammoniakbildung.

W. H. EASTON<sup>10</sup>, S. H. SHEIB<sup>11</sup> und L. H. INGHAM<sup>12</sup> haben das Verfahren nachgeprüft und als sehr brauchbar befunden.

<sup>1</sup> J. KÖNIG: Rep. analyt. Chem. 1883, 3, 1.

<sup>2</sup> O. BÖTTCHER: Landw. Vers.-Stationen 1892, 41, 165.

<sup>3</sup> A. DEVARDA: Chem. Ztg. 1892, 16, 1952. — K. WÖLDICH (Österr. Chemiker-Ztg. 1929, 32, 183; C. 1930, I, 864) hat für die DEVARDasche Methode ein Mikroverfahren ausgearbeitet.

<sup>4</sup> TH. ARND: Zeitschr. angew. Chem. 1917, 30, I, 169; 1920, 33, 296.

<sup>5</sup> F. M. SCALES: Journ. Biol. Chem. 1916, 27, 327; C. 1917, I, 815.

<sup>6</sup> C. J. VAN NIEUWENBURG u. G. P. DE GROOT: Chem. Weekbl. 1927, 24, 202; Z. 1930, 59, 523.

<sup>7</sup> A. SEYEWETZ u. SALQUE: Bull. Soc. chim. France 1929, (4) 45, 463; C. 1929, II, 1829

<sup>8</sup> Die „ARNDsche Legierung“ liefert die Aluminium-Magnesium-Fabrik A. G. in Hemelingen bei Bremen.

<sup>9</sup> VORTMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1890, 23, 2798.

<sup>10</sup> W. H. EASTON: Journ. Amer. Chem. Soc. 1903, 25, 1042.

<sup>11</sup> S. H. SHEIB: Proceedings of the 20. Annual Convention of the Official Agricultural Chemists 1903. Herausgeg. von H. W. WILEY, S. 87—88. Washington 1904; Z. 1905, 9, 146.

<sup>12</sup> L. H. INGHAM: Journ. Amer. Chem. Soc. 1904, 26, 1251.

S. H. SHEIB schlägt folgende Arbeitsweise vor: 0,35—0,5 g Natriumnitrat bzw. diesen entsprechende Mengen anderer Nitrate und 1—2 g Kupfersulfat werden in Wasser gelöst, 20 ccm Schwefelsäure (Spez. Gewicht 1,062) hinzugefügt und die Lösung auf 200—250 ccm verdünnt. Die Elektroden bestehen aus Platinzylindern von 100 qcm Fläche, durch welche ein Strom von 0,15—0,30 Ampère und 2—3 Volt hindurchgeleitet wird. Die Reduktion ist bei Zimmertemperatur über Nacht beendet. Nach INGHAM läßt sich die Bestimmung durch Verwendung von rotierenden Elektroden und bei Titration der verschwundenen Säure in 35 Minuten beenden.

Nach L. SZEBELLÉDY und B. M. SCHALL<sup>1</sup> kann man der zu elektrolysierenden Lösung statt Schwefelsäure auch Borsäure zusetzen und damit das entstandene Ammoniak nach S. 646 direkt mit Salzsäure titrieren.

### 3. Nitronverfahren nach M. BUSCH<sup>2</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Schwerlöslichkeit des Nitrates des Nitrons<sup>3</sup> (= Diphenyl-endanilo-dihydrotriazol  $C_{20}H_{16}N_4 \cdot HNO_3$ ) in kalter wäßriger Lösung. Man verfährt nach A. GUTBIER<sup>4</sup> und L. W. WINKLER<sup>5</sup> am besten folgendermaßen:

Man löst eine etwa 0,1—0,15 g Kaliumnitrat entsprechende Menge der nitrathaltigen Substanz in 80 ccm Wasser in einem mit einem Uhrglase bedeckten Becherglase auf und erhitzt die Lösung nach Zugabe von Essigsäure bis zum beginnenden Sieden; dann entfernt man die Flamme und fügt zu der heißen Lösung 12—15 ccm einer 10%igen Lösung von Nitron in 5%iger Essigsäure<sup>6</sup> bzw. 10%ige Nitronacetatlösung hinzu. Das Reaktionsgemisch wird mit einem kurzen Glasstabe umgerührt und dann  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunde sich selbst überlassen. In der anfangs noch klaren, durch das Nitronacetat etwas gelblich gefärbten Flüssigkeit beginnt direkt oder nach kurzer Zeit — meist bei einer Temperatur von 50—60° — die Abscheidung des in prächtigen, seidenartigen dünnen Nadeln kristallisierenden Nitronnitrats, welches bald die ganze Flüssigkeit durchsetzt und sich nach und nach am Boden des Becherglases ablagert. Man läßt das Gemisch 24 Stunden bei Zimmertemperatur<sup>7</sup> stehen und filtriert dann den Niederschlag bei schwach arbeitender Saugpumpe unter Dekantation mit der Mutterlauge (was ohne jeden Verlust leicht geht) durch einen bei 105 bis 110° bis zur Gewichtsbeständigkeit getrockneten NEUBAUER-Tiegel oder durch ein Trichterrohr mit Asbestfilter und saugt ihn erst dann fest an, wenn das Becherglas auch nicht mehr die geringsten Spuren des Niederschlages enthält. Zum Auswaschen benutzt man 10—12 ccm Wasser<sup>8</sup> von 0° und bringt davon jedesmal etwa 1 ccm mit dem ganzen Niederschlag in Berührung. Nach Entfernung der letzten Spuren des Waschwassers durch scharfes Ansaugen

<sup>1</sup> L. SZEBELLÉDY u. B. M. SCHALL: Zeitschr. analyt. Chem. 1931, 86, 127.

<sup>2</sup> M. BUSCH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 861; Z. 1905, 9, 464.

<sup>3</sup> Das Nitron wird von der Firma E. Merck in Darmstadt hergestellt; die gelbe Base soll sich in 5%iger Essigsäure bei gewöhnlicher Temperatur leicht lösen. Etwa ungelöst bleibende Teilchen filtriert man ab. Die meist etwas rötlich gefärbte Lösung läßt sich in einer dunklen Flasche lange Zeit unverändert aufbewahren.

<sup>4</sup> A. GUTBIER: Zeitschr. angew. Chem. 1905, 18, 494.

<sup>5</sup> L. W. WINKLER: Zeitschr. angew. Chem. 1921, 34, 46.

<sup>6</sup> An Stelle der essigsäuren Lösung kann man nach M. BUSCH auch Nitronsulfat verwenden und die zu untersuchende Lösung auch mit 12—15 Tropfen verd. Schwefelsäure ansäuern. Das Nitronsulfat hat den Vorzug, daß es sich leichter rein gewinnen läßt als die Base und unbegrenzt haltbar ist. Da es jedoch in kaltem Wasser nur 1 : 40 löslich ist, so kann man Lösungen der wünschenswerten Konzentration nicht vorrätig halten, sondern man muß das Salz (1,5 g) vor jeder Bestimmung in warmem Wasser, in dem es sehr leicht löslich ist, auflösen. Das Nitronsulfat wird ebenfalls von der Firma E. Merck in Darmstadt hergestellt.

<sup>7</sup> BUSCH hatte ursprünglich empfohlen, die Fällung 1—1½ Stunden in Eiswasser zu stellen.

<sup>8</sup> L. W. WINKLER empfiehlt Auswaschen mit an Nitronnitrat gesättigtem Wasser.

wird der Tiegel bzw. das Filterrohr bei 105—110° bis zur Gewichtsbeständigkeit getrocknet; diese tritt meist nach etwa 45 Minuten ein.

Nitronnitrat  $\times 0,1679 =$  Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) und  $\times 0,1439 =$  Salpetersäureanhydrid ( $\text{N}_2\text{O}_5$ ).

Die Ergebnisse sind nach A. GUTBIER genauer, als sie nach den anderen bekannten Verfahren erhalten werden. M. BUSCH und A. GUTBIER empfehlen das Nitronverfahren unter anderem auch für die Salpetersäurebestimmung im Wasser; C. PAAL und G. MEHRTENS<sup>1</sup> verwendeten es zur Bestimmung des Salpeters in Fleischwaren, C. PAAL und E. WEIDENKAFF<sup>2</sup>, sowie E. FISCHER und U. SUZUKI<sup>3</sup> bei organischen Nitraten, W. TRAUBE und A. BLITZ<sup>4</sup> bei nitrithaltigen Nitratlösungen.

Bei Gegenwart von Bromwasserstoff, Jodwasserstoff, Salpetriger Säure, Chromsäure, Chlorsäure und Überchlorsäure, Rhodanwasserstoffsäure, Ferro- und Ferricyanwasserstoffsäure sowie Pikrinsäure ist das Nitronverfahren nicht ohne weiteres anwendbar, da diese Säuren mit dem Nitron ebenfalls schwerlösliche Salze bilden. Diese Säuren müssen daher vorher entfernt werden.

Zur Bestimmung von Salpetersäure und Salpetriger Säure nebeneinander empfiehlt M. BUSCH<sup>5</sup> in einem Teil der Lösung die Salpetrige Säure mit Kaliumpermanganat zu titrieren, in einem anderen Teile der Lösung die Salpetrige Säure mit Wasserstoff-superoxyd in schwach schwefelsaurer Lösung zu Salpetersäure zu oxydieren und darauf die Gesamtmenge der Salpetersäure mit Nitron zu bestimmen.

#### 4. Colorimetrisches Verfahren mit Diphenylamin<sup>6</sup>.

Dieses Verfahren eignet sich namentlich zur Bestimmung sehr geringer Mengen Salpetersäure (0,1—10 mg  $\text{N}_2\text{O}_5$  im Liter). J. TILLMANS<sup>7</sup> hat es insbesondere zur Bestimmung der Salpetersäure in Wasser und Milch ausgearbeitet. Das Diphenylaminreagens ist das gleiche, wie es TILLMANS für den Nachweis der Salpetersäure empfohlen hat (S. 651). Man verfährt nach seinem Vorschlage bei der Bestimmung der Salpetersäure, z. B. in Wasser, wie folgt:

Man stellt zunächst Vergleichslösungen her, indem man in 100 ccm-Kölbchen 2 ccm gesättigte Natriumchloridlösung und dann 0,5, 1, 1,5, 2,0 und 2,5 ccm einer Kaliumnitratlösung (0,1872 g Kaliumnitrat im Liter) hinzusetzt, von der 1 ccm 0,1 mg Salpetersäure entspricht, gibt dann 10 ccm Eisessig<sup>8</sup> hinzu und füllt mit Wasser auf 100 ccm auf. Diese Vergleichslösungen enthalten demnach 0,5, 1 usw. mg Salpetersäure je Liter; Lösungen mit höherem Salpetersäuregehalt sind nicht mehr vergleichbar und müssen daher vor der Bestimmung entsprechend verdünnt werden, wozu man Wasser verwendet, dem auf 100 ccm 2 ccm gesättigte Natriumchloridlösung zugesetzt sind.

Man führt die Bestimmung in dem zu untersuchenden Wasser, dem man 2 ccm kalt gesättigte Natriumchloridlösung zusetzt gleichzeitig und unter genau den gleichen Bedingungen mit solchen in den Vergleichslösungen aus, indem man mittels einer feingeteilten 1 ccm-Pipette 1 ccm des Wassers in ein Reagenrohr gibt, 4 ccm Reagens an der Wand des Reagenrohres langsam herunterfließen läßt, kurz kräftig schüttelt, sofort unter der Wasserleitung abkühlt, unter mehrmaligem Umschütteln<sup>9</sup> 1 Stunde stehen läßt und die bei Gegenwart von Salpetersäure entstandene Blaufärbung mit der der Vergleichslösungen im durchfallenden und im auffallenden Tageslicht vergleicht.

<sup>1</sup> C. PAAL u. G. MEHRTENS: Z. 1906, 12, 410. — Vgl. auch K. KROG u. J. SEBELIEN: Chem.-Ztg. 1911, 35, 145.

<sup>2</sup> C. PAAL u. E. WEIDENKAFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 1688.

<sup>3</sup> E. FISCHER u. U. SUZUKI: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 4190.

<sup>4</sup> W. TRAUBE u. A. BLITZ: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 168.

<sup>5</sup> M. BUSCH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 1401.

<sup>6</sup> Über die Verwendung von Diphenylbenzidin an Stelle von Diphenylamin siehe Anmerkung 2 auf S. 650.

<sup>7</sup> J. TILLMANS: Z. 1910, 20, 676. — J. TILLMANS u. W. SUTTHOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1911, 50, 473. — J. TILLMANS u. A. SPLITTGERBER: Z. 1911, 22, 401. — J. TILLMANS u. W. SCHNEEHAGEN: Z. 1916, 31, 341.

<sup>8</sup> Der Zustand des Eisessigs verhindert das Bakterienwachstum; die damit hergestellten Vergleichslösungen sind haltbar.

<sup>9</sup> L. SMITH (Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 28), der die Brauchbarkeit des Verfahrens bestätigt, hat vorgeschlagen, die Reaktionsflüssigkeit zu rühren anstatt zu schütteln, weil durch letzteres eine Abnahme der Färbung eintreten könne. J. TILLMANS (Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 509) hält diese Abänderung für überflüssig.

## 5. Sonstige Verfahren.

Eine Reihe weiterer Verfahren ist besonders für die Bestimmung der Salpetersäure im Wasser vorgeschlagen worden, wie das Indigoverfahren von MARX-TROMMSDORFF und das Brucinverfahren von H. NOLL<sup>1</sup>; hierüber siehe den Abschnitt „Wasser“ in Bd. VIII. Von sonstigen, meist noch nicht näher geprüften Verfahren seien hier noch folgende genannt, die zum Teil ebenfalls in erster Linie für die Bestimmung der Salpetersäure im Wasser bestimmt sind:

a) G. ROMIJN<sup>2</sup> führt die Nitrate in Gegenwart von Ammoniumsalzen und freiem Ammoniak durch Zinkstaub in die Nitrite über und bestimmt deren Menge durch Titration mit Kaliumpermanganatlösung oder bei geringeren Mengen colorimetrisch mit  $\alpha$ -Naphthylamin und Sulfanilsäure (S. 665).

b) A. QUARTAROLI<sup>3</sup> reduziert die Salpetersäure nach der Gleichung  $2 \text{KNO}_3 + 6 \text{H} \cdot \text{COOH} = \text{N}_2\text{O} + 4 \text{CO}_2 + 5 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H} \cdot \text{COOK}$  zu Stickstoffoxydul und bestimmt dessen Menge im Eudiometerrohr.

c) R. C. BURRELL und TH. G. PHILLIPS<sup>4</sup> haben das colorimetrische Verfahren von A. GRANDVAL und H. LAJOUX<sup>5</sup>, beruhend auf der Überführung der Nitrate in die gelben Alkalisalze einer Nitrophenolsulfosäure mittels Phenolsulfosäure und Ammoniak, auch zur Bestimmung der Nitrate in Pflanzenstoffen empfohlen. Salpetrige Säure gibt die gleiche Reaktion.

d) L. U. DE NARDO<sup>6</sup> beschreibt ein colorimetrisches Verfahren, welches auf der Rotfärbung mit Pyrogallolsulfosäure beruht; für die Bestimmung der Nitrate im Wasser. Salpetrige Säure zeigt die gleiche Reaktion.

e) G. BINI hat sein Verfahren zum Nachweis der Nitrate (S. 652) auch für deren Bestimmung empfohlen.

f) J. BLOM und C. TRESCHOW<sup>7</sup> haben für die Bestimmung der Nitrate im Wasser ein colorimetrisches Verfahren beschrieben, das auf der Oxydation von Oxydimethylbenzol zu Nitroxyphenol beruht.

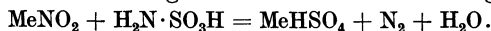
g) A. W. WELLINGS<sup>8</sup> titriert die Nitrate mit Titanochlorid unter Verwendung von Alizarin als Indicator.

## VI. Salpetrige Säure.

### A. Nachweis der Salpetrigen Säure.

Für den Nachweis der Salpetrigen Säure ist neben den bekannten, nicht sehr empfindlichen Fällungsreaktionen mit Silbernitrat und Kobaltsalzen und den allgemeinen Oxydationsreaktionen eine große Reihe von Verfahren vorgeschlagen worden, von denen die meisten in erster Linie für den Nachweis in Trinkwasser bestimmt sind. Von den wichtigsten dieser Verfahren, die auch zum Teil eine anderweitige Anwendung gestatten, seien die folgenden hier näher beschrieben:

1. Reaktion mit Aminosulfonsäure nach P. BAUMGARTEN und I. MARGGRAFF<sup>9</sup>: Aminosulfonsäure<sup>10</sup> reagiert mit Nitriten nach folgender Formel:



<sup>1</sup> H. NOLL: Zeitschr. angew. Chem. 1901, 1318.

<sup>2</sup> G. ROMIJN: Pharm. Weekbl. 1911, 48, 753; Z. 1912, 24, 586.

<sup>3</sup> A. QUARTAROLI: Gazz. chim. Ital. 1911, 41, II, 53; Z. 1912, 14, 337.

<sup>4</sup> R. C. BURRELL u. TH. G. PHILLIPS: Journ. Biol. Chem. 1925, 65, 229; C. 1826, II, 2095.

<sup>5</sup> A. GRANDVAL u. H. LAJOUX: Compt. rend. Paris 1885, 101, 62; Zeitschr. analyt. Chem. 1886, 25, 564. Siehe auch W. LÜHR: Z. 1933, 66, 545 und B. A. SKOPINTZEW: Journ. angew. Chem. (russ.) 1930, 3, 747; 1931, 4, 716; C. 1930, II, 3323; 1932, I, 2364.

<sup>6</sup> L. U. DE NARDO: Compt. rend. Paris 1929, 188, 563; C. 1929, II, 1063.

<sup>7</sup> J. BLOM u. C. TRESCHOW: Zeitschr. Pflanzenernähr. Düngung Abt. A 1929, 13, 159; C. 1929, I, 2098.

<sup>8</sup> A. W. WELLINGS: Trans. Faraday Soc. 1932, 28, 665; C. 1932, II, 2339.

<sup>9</sup> P. BAUMGARTEN u. I. MARGGRAFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 1019.

<sup>10</sup> Die Aminosulfonsäure wird nach dem Verfahren von P. BAUMGARTEN (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, 59, 1978) dargestellt.

Die Reaktion verläuft bei mäßiger Konzentration der Lösungen sehr energisch unter starker Erwärmung und Schaumbildung durch den entweichenden Stickstoff sofort; bei konzentrierteren Lösungen ist sie in etwa 1 Minute beendet. Salpetersäurebildung findet dabei in verdünnten Lösungen nicht statt. In der Nitritlösung schon vorhandene Nitrate reagieren nicht; der Nachweis der Salpetrigen Säure kann daher neben Salpetersäure erfolgen, auch in gefärbten Lösungen.

Zu 1 ccm der bis zu 0,5 mol/l Nitrit enthaltenden neutralen Lösung setzt man in einem Guß die 0,5—2%ige Aminosulfonsäurelösung, läßt kurze Zeit, ohne umzuschwenken, stehen und schüttelt dann erst um, bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Darauf setzt man Bariumchloridlösung hinzu; entsteht dabei ein Niederschlag von Bariumsulfat, so ist Nitrit nachgewiesen. Empfindlichkeit: 2 mg/l. In der abfiltrierten Lösung kann noch 1 Tl. Nitrat neben 1000 Tln. Nitrit mit Diphenylamin nachgewiesen werden.

**2. Reaktion mit Kaliumjodid.** Salpetrige Säure scheidet wie viele andere oxydierenden Stoffe aus Kaliumjodid Jod aus.

L. W. WINKLER<sup>1</sup> verfährt für den Nachweis von Salpetriger Säure im Trinkwasser, wie folgt: 100 ccm des klaren Wassers werden mit 1 ccm Stärkelösung<sup>2</sup>, 1—2 ccm Phosphorsäure (25%) und dann mit 0,2 g Kaliumjodid (reinst) versetzt. Je nach dem Gehalt an Salpetriger Säure wird die Flüssigkeit sofort oder nach 3 Minuten Stehen im Dunkeln mehr oder weniger stark blau. Die Reaktion tritt auch mit Wasserstoffsperoxyd, freiem Chlor und Ferrerverbindungen ein.

Statt Kaliumjodid und Stärkelösung wird auch vielfach eine Zinkjodid-Stärkelösung verwendet, die sehr haltbar ist und folgendermaßen hergestellt wird: Man verreibt 4 g Stärkemehl mit wenig Wasser, gießt die Flüssigkeit unter Umrühren nach und nach in eine siedende Lösung von 20 g reinem Zinkchlorid in 100 ccm Wasser und setzt das Erhitzen unter Ersatz des verdampfenden Wassers fort, bis die Stärke möglichst gelöst ist. Alsdann verdünnt man mit Wasser und setzt 2 g reines trockenes Zinkjodid hinzu, füllt auf 1 Liter auf und filtriert. Die Lösung darf sich, mit dem 50fachen Volumen Wasser verdünnt, beim Ansäuern mit Schwefelsäure nicht blau färben. Zum Nachweise von Salpetriger Säure in Wasser säuert man 10 ccm mit einigen Tropfen verd. Schwefelsäure an und gibt 1 ccm Zinkjodid-Stärkelösung hinzu.

**3. Reaktion mit Naphthylamin-Sulfanilsäure.** Diese von P. GRIESS<sup>3</sup> angegebene, von I. v. ILOSVAY<sup>4</sup> und G. LUNGE<sup>5</sup> abgeänderte Reaktion beruht darauf, daß in einer essigsauren Naphthylamin-Sulfanilsäurelösung bei Gegenwart kleinster Mengen Salpetriger Säure eine Rotfärbung eintritt, indem die Salpetrige Säure die Sulfanilsäure in die entsprechende Diazoverbindung überführt, welche sich dann mit dem Naphthylamin zu einem roten Farbstoff verbindet.

Darstellung des Reagens. Man löst einerseits 0,5 g Sulfanilsäure in 150 ccm 30%iger Essigsäure und kocht andererseits 0,1 g festes Naphthylamin mit 20 ccm Wasser, gießt die farblose Lösung von dem blauvioletten Rückstand ab, versetzt sie mit 150 ccm verd. Essigsäure und gießt dann beide Lösungen zusammen. Das Reagens wird in gut verschlossenen Fläschchen, deren Stopfen mit einer Paraffinschicht überzogen ist, aufbewahrt. F. L. HAHN und G. JAEGER<sup>6</sup> beschreiben die Darstellung eines festen unbegrenzt haltbaren Reagens, mit dem noch 0,001 mg/l NaNO<sub>2</sub> im Wasser nachweisbar ist.

<sup>1</sup> L. W. WINKLER: Z. 1915, 29, 10 und L. W. WINKLER in LUNGE-BERL, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, 7. Aufl. Bd. I, S. 520 bzw. 8. Aufl. Bd. II, 1, S. 250. Berlin: Julius Springer 1921 bzw. 1932.

<sup>2</sup> 1 g pulverförmige „lösliche Stärke“ wird mit einigen Kubikzentimeter Wasser aufgeschüttelt und in 100 ccm kochendes Wasser gegossen. Die Stärkelösung kann durch Sättigung mit Natriumchlorid haltbar gemacht werden.

<sup>3</sup> P. GRIESS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1879, 12, 427.

<sup>4</sup> I. v. ILOSVAY: Bull. Soc. chim Paris 1889, (3) 2, 347; C. 1889, II, 809.

<sup>5</sup> G. LUNGE: Zeitschr. angew. Chem. 1889, 665. — Vgl. auch G. LUNGE u. A. LWOFF: Zeitschr. angew. Chem. 1894, 345.

<sup>6</sup> F. L. HAHN u. G. JAEGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1925, 58, 2335.

20 ccm der zu prüfenden Lösung (Wasser) werden mit 2—3 ccm des Reagens vermischt und auf 70—80° erwärmt. Bereits bei einem Gehalt von 0,01 mg/l Salpetriger Säure tritt binnen 1 Minute eine deutliche Rosafärbung ein.

**4. Reaktion mit Diphenylamin.** Nach J. TILLMANS und W. SUTTHOFF<sup>1</sup> kann das Reagens auf Salpetersäure (S. 651), das in gleicher Stärke mit Salpetriger Säure reagiert, auch zum Nachweise von letzterer allein verwendet werden, wenn man 500 ccm davon mit 200 ccm Wasser verdünnt oder bei der Herstellung des Reagens nach der obigen Vorschrift (S. 651) statt 0,085 g nur 0,06 g Diphenylamin und statt 190 ccm 325 ccm Schwefelsäure (1 + 3) verwendet.

Ausführung der Reaktion. Zu 5 ccm der auf Nitrit zu prüfenden Lösung (z. B. Wasser) läßt man in einem Reagenrohr mittels einer Pipette 5 ccm Nitritreagens der Rohrwand entlang fließen, mischt und kühlt unter der Wasserleitung. Bei Gegenwart von Salpetriger Säure tritt die Blaufärbung in etwa gleicher Stärke wie bei der Nitratreaktion ein; es ist auf diese Weise auch schon 0,1 mg Salpetrige Säure durch eine deutliche Blaufärbung nachweisbar.

Andere Oxydationsmittel, wie Ferriverbindungen, freies Chlor reagieren in gleicher Weise wie Salpetrige Säure (s. unter 5).

**5. Reaktion mit Metaphenylendiamin.** Die Reaktion beruht auf der von P. GRIESS<sup>2</sup> beobachteten Umwandlung des Metaphenylendiamins (Metadiamidobenzol) durch Salpetrige Säure in Triamidoazobenzol (Bismarckbraun). TREMANN und PREUSSE<sup>3</sup> haben dieses Verfahren zuerst zum Nachweise und zur Bestimmung von Salpetriger Säure im Wasser verwendet; es lassen sich noch 0,03 mg N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> im Liter nachweisen, die sich nach 10 Minuten durch eine gelbliche Färbung zu erkennen geben.

Das Reagens wird durch Lösung von 0,5 g Metaphenylendiamin in verd. Schwefelsäure und Auffüllen auf 100 ccm hergestellt. Falls die Lösung gefärbt ist, wird sie durch Erwärmen mit unter Luftabschluß ausgeglühter Tierkohle entfärbt.

Zum Nachweise von Salpetriger Säure werden 100 ccm der zu untersuchenden Lösung (Wasser) in einem hohen Zylinder mit 1—2 ccm Schwefelsäure (1:3) angesäuert und mit 1 ccm Reagens versetzt. Bei Gegenwart von Salpetriger Säure färbt sich die Lösung gelblich bis braun<sup>4</sup>.

Hypochlorite und -bromite und andere Oxydationsmittel reagieren gleichfalls mit dem Reagens.

**6. Reaktion mit Resorcin.** Diese Reaktion wurde von G. DENIGÈS<sup>5</sup> vorgeschlagen. Zu 10 Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit gibt man 2 ccm konz. Schwefelsäure und schüttelt mit 5 Tropfen Resorcinlösung (1 g Resorcin und 10 Tropfen Schwefelsäure in 100 ccm Wasser). Bei Gegenwart von Salpetriger Säure entsteht eine carminrote bis violettblaue Färbung. H. BERGER<sup>6</sup> hat die Reaktion bei Wasser geprüft und macht nähere Angaben über ihr Wesen.

**7. Reaktion mit Indol.** Diese Reaktion wird von A. DANÉ<sup>7</sup>, O. BUJWID<sup>8</sup> und H. BERGER<sup>9</sup> empfohlen. Sie beruht auf der Bindung der Salpetrigen Säure an Indol (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>:NH) zu Nitrosoindol (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>:N·NO). Man verfährt, nach H. BERGER bei Trinkwasser, wie folgt: Zu 100 ccm Wasser gibt man 1 ccm Schwefelsäure

<sup>1</sup> J. TILLMANS u. W. SUTTHOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1911, 50, 473.

<sup>2</sup> P. GRIESS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1878, 11, 624.

<sup>3</sup> TREMANN u. PREUSSE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1878, 11, 627.

<sup>4</sup> L. W. WINKLER: In LUNGE-BERL, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, 8. Aufl., Bd. II, 1, S. 251. Berlin: Julius Springer 1932.

<sup>5</sup> G. DENIGÈS: Pharm. Zentralh. 1896, 37, 254; Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 310.

<sup>6</sup> H. BERGER: Z. 1920, 40, 232.

<sup>7</sup> A. DANÉ: Bull. Soc. chim. France (4) 9, 354; Chem.-Ztg. 1910, 34, 1057.

<sup>8</sup> O. BUJWID: Chem.-Ztg. 1894, 18, 364.

<sup>9</sup> H. BERGER: Z. 1920, 40, 225.

(1 + 3) und 1—2 ccm alkoholische Indollösung (0,02 g Indol, gelöst in 150 ccm 95%igem Alkohol). Bei 0,025 mg/l entsteht eine hellviolette, bei 1 mg/l eine dunkelviolette und bei 10 mg/l  $N_2O_3$  eine rote Färbung. Das Reagens und die Färbungen sind haltbar; Eisen, Nitrate, andere Oxydationsmittel und organische Stoffe beeinträchtigen die Reaktion nicht. M. CHWILEWSKY<sup>1</sup> sowie L. ROSENTHALER und V. JAHN<sup>2</sup> empfehlen die Reaktion ebenfalls.

8. Sonstige Reaktionen<sup>3</sup>. Außer den vorstehend beschriebenen ist noch eine große Zahl anderer Reaktionen, namentlich zum Nachweise der Salpetrigen Säure in Trinkwasser, empfohlen, von denen hier folgende genannt seien:

Ferrocyankalium (BLUNT<sup>4</sup>), Sulfanilsäure und Phenol (L. ZAMBELLI<sup>5</sup> und LOMBARD<sup>6</sup>), Sulfanilsäure und  $\alpha$ -Naphthol (ZAMBELLI<sup>7</sup>), Sulfanilsäure und Amido-naphthol-disulfosäure (E. ERDMANN<sup>8</sup>), Paraamidobenzoesäureester (E. ERDMANN<sup>9</sup>), Diamidobenzoesäure (P. GRIESS<sup>10</sup>), Naphthionsäure (E. RIEGLER<sup>11</sup>), Anilinacetat (G. DENIGÈS<sup>12</sup>), Dimethylanilin (E. H. MILLER<sup>13</sup>), Gallussäure (DAVY<sup>14</sup>), Walnußkernhautextrakt (P. ZYWNEV<sup>15</sup>), Guajacol (SPIEGEL<sup>16</sup>), Brucin (PICHARD<sup>17</sup>), Neutralrot (ST. VERGNOUX<sup>18</sup>), Apomorphin (F. PAVELKA<sup>19</sup>), Diphenylbenzidin (M. WHELAN<sup>20</sup>).

## B. Bestimmung der Salpetrigen Säure.

Von den nachstehenden sind die Verfahren 1—7 in erster Linie zur Bestimmung größerer Nitritmengen in Salzen geeignet, während die colorimetrischen Verfahren (8) nur zur Bestimmung kleinerer Nitritmengen in Frage kommen.

Zur Bestimmung von Nitraten und Nitriten nebeneinander dienen vorwiegend die Verfahren 5 und 6.

### 1. Titration mit Kaliumpermanganat.

Bei Pökelsalzen<sup>21</sup> und ähnlichen, größere Mengen Salpetrige Säure enthaltenden Salzen verfährt man, wie folgt:

a) Nach G. LUNGE<sup>22</sup>: Zu der auf 250 ccm verdünnten Lösung von 30 ccm 0,5 N.-Kaliumpermanganatlösung, welche mit 20 ccm 20%iger Schwefelsäure angesäuert und auf 40° erwärmt ist, läßt man unter stetem Umschütteln aus einer Bürette die Nitritlösung, zuletzt tropfenweise bis zur Entfärbung der Permanganatlösung hinzuzufießen. 1 ccm 0,5 N.-Permanganatlösung = 0,0175 g Natriumnitrit = 0,0095 g Salpetrige Säure ( $N_2O_3$ ).

<sup>1</sup> M. CHWILEWSKY: Arch. Hygiene 1912, **76**, 401.

<sup>2</sup> L. ROSENTHALER u. V. JAHN: Schweiz. Apoth.-Ztg. 1915, **30**, 265; **Z.** 1919, **37**, 92.

<sup>3</sup> Vgl. dazu H. BERGER: **Z.** 1920, **40**, 225. — L. ROSENTHALER u. V. JAHN: Schweiz. Apoth.-Ztg. 1915, **30**, 265; **Z.** 1919, **37**, 92.

<sup>4</sup> BLUNT: Analyst 1903, **28**, 313.

<sup>5</sup> L. ZAMBELLI: Journ. Chem. Soc. **52**, 533.

<sup>6</sup> W. LOMBARD: Zeitschr. analyt. Chem. 1914, **53**, 133.

<sup>7</sup> L. ZAMBELLI: Ann. Chim. e Farmacol. 1886, **231**; **C.** 1887, **45**.

<sup>8</sup> E. ERDMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1900, **33**.

<sup>9</sup> E. ERDMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1900, **714**.

<sup>10</sup> P. GRIESS: Liebigs Ann. **154**, 333.

<sup>11</sup> E. RIEGLER: Zeitschr. analyt. Chem. 1896, **35**, 677; 1897, **36**, 306.

<sup>12</sup> G. DENIGÈS: Chem. News **73**, 27; Zeitschr. analyt. Chem. 1897, **36**, 310.

<sup>13</sup> E. H. MILLER: Analyst 1912, **37**, 345; **Z.** 1913, **25**, 161.

<sup>14</sup> DAVY: Zeitschr. analyt. Chem. 1884, **23**, 72.

<sup>15</sup> P. ZYWNEV: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, **79**, 389.

<sup>16</sup> SPIEGEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1900, **33**, 639.

<sup>17</sup> PICHARD: Rep. Pharm. 1897, **110**; Pharm. Zentralh. 1897, **33**, 326.

<sup>18</sup> ST. VERGNOUX: Bull. Sciences pharmacol. 1929, **36**, 146; **C.** 1929, **II**, 82.

<sup>19</sup> F. PAVELKA: Mikrochemie 1930, **8**, 46; **C.** 1930, **I**, 1503.

<sup>20</sup> M. WHELAN: Journ. Biol. Chem. 1930, **86**, 189; **C.** 1930, **I**, 3705.

<sup>21</sup> Vgl. dazu W. PLÜCKER: **Z.** 1934, **68**, 187.

<sup>22</sup> G. LUNGE: Zeitschr. angew. Chem. 1891, **4**, 629; Chem.-Ztg. 1904, **28**, 501.



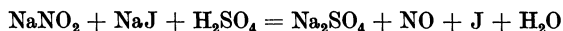
b) Nach F. RASCHIG<sup>1</sup>: Man gibt zu 20 ccm der etwa 0,1 N.-Nitritlösung in einem Glasstöpselglase 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung im Überschuß (etwa 20%), säuert mit 1 ccm 10 N.-Schwefelsäure an, setzt nach 2 Minuten 5 ccm 10%ige Kaliumjodidlösung hinzu und titriert das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung.

c) Nach E. RUPP<sup>2</sup> verläuft die Oxydation in alkalischer Kaliumpermanganatlösung rascher als in saurer und außerdem kommt dabei ein Verlust von Salpetriger Säure nicht in Frage. Er gibt zu der höchstens 1%igen Nitritlösung einen reichlichen Überschuß von 0,1 N.-Permanganatlösung sowie 1 g Natriumcarbonat (wasserfrei) und etwas Wasser und läßt 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Darauf wird mit etwa 75 ccm Wasser verdünnt und angesäuert. Nach Zugabe von 1 g Kaliumjodid wird mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung titriert.

Bei Lösungen, welche nur geringe Mengen Salpetriger Säure enthalten, z. B. bei Wasser, setzt man nach FELDHAUS-KUBEL zu 100 ccm einen Überschuß von 0,01 N.-Kaliumpermanganatlösung (0,315 g Kaliumpermanganat in 1 Liter), säuert mit 5 ccm verd. Schwefelsäure (1:3) an und läßt bei 15° stehen. Darauf setzt man die gleiche Menge 0,01 N.-Ferroammoniumsulfatlösung (3,9208 g des Salzes in 1 Liter) hinzu und titriert den Überschuß der letzteren mit Permanganatlösung zurück. 1 ccm 0,01 N.-Permanganatlösung = 0,19 mg Salpetriger Säure (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

## 2. Jodometrische Verfahren.

a) J. MEISENHEIMER und F. HEIM<sup>3</sup> haben ein auf der Reaktion



beruhendes gasvolumetrisches Verfahren beschrieben, welches die Bestimmung von Salpetriger Säure und Salpetersäure in einem Arbeitsgange gestattet. In ähnlicher Anordnung wie bei dem SCHLÖSINGSchen Verfahren der Salpetersäurebestimmung (S. 652) wird ein 50 ccm-Rundkolben mit dreifach durchbohrtem Gummistopfen (Abb. 9, S. 655), welcher die schwach alkalische Nitritlösung mit 0,1—0,2 g Nitrit enthält, zunächst durch einen luftfreien Kohlensäurestrom von Luft befreit; dann werden durch den Hahntrichter 10—15 ccm 5%ige Kaliumjodidlösung und ebensoviel verd. Salzsäure zufließen gelassen. Die sofort in obigem Sinne eintretende Reaktion wird durch gelindes Erwärmen, schließlich bis zum beginnenden Sieden, zu Ende geführt und das entwickelte Stickoxyd im Kohlensäurestrom in einem Eudiometerrohr über 12%iger Natronlauge aufgefangen und wie beim SCHLÖSINGSchen Verfahren bestimmt.

Soll im Destillationsrückstande auch die Salpetersäure bestimmt werden, so gibt man durch das Trichterrohr 10—20 ccm einer stark salzsauren konzentrierten Eisenchlorürlösung hinzu, verfährt weiter wie beim SCHLÖSINGSchen Verfahren und fängt das dabei entwickelte Stickoxyd in einem neuen Eudiometerrohr auf.

b) F. RASCHIG<sup>4</sup> hat dieses Verfahren in ein maßanalytisches umgewandelt: Man bringt die etwa 100 ccm Nitritlösung, welche nicht sauer sein darf, in einen 200 ccm-ERLENMEYER-Kolben, fügt 5—10 ccm 10%ige Kaliumjodid-

<sup>1</sup> F. RASCHIG: Zeitschr. angew. Chem. 1904, 17, 577; 1905, 18, 1286; Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 3911.

<sup>2</sup> E. RUPP: Zeitschr. analyt. Chem. 1906, 45, 687.

<sup>3</sup> J. MEISENHEIMER u. F. HEIM: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 3834.

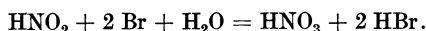
<sup>4</sup> F. RASCHIG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 3911. — Vgl. auch W. PLÜCKER: Z. 1934, 68, 187.

lösung hinzu und leitet durch ein bis fast auf den Boden reichendes Glasrohr einen ziemlich kräftigen Kohlensäurestrom durch die Lösung. Nach 2—3 Minuten läßt man an dem Glasrohr ein wenig Schwefelsäure (etwa 1 ccm 10 N.-Säure) herunterlaufen, um das Jod in Freiheit zu setzen, und nach weiteren 2 Minuten beginnt man mit der Titration, wobei man ebenfalls die 0,1 N.-Thiosulfatlösung an dem Glasrohr herablaufen läßt. Man führt dann die Titration unter Zusatz von Stärkelösung zu Ende. Ein Schütteln des Kolbens ist zu vermeiden; die Flüssigkeit wird durch die Kohlensäureblasen hinreichend durchmischt. 1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung = 0,0069 g  $\text{NaNO}_2$  = 0,0037 g  $\text{N}_2\text{O}_3$ .

L. W. WINKLER<sup>1</sup> hat dieses Verfahren zur Bestimmung geringer Mengen Salpetriger Säure in Trinkwasser verwendet.

### 3. Bromometrisches Verfahren von E. RUPP und F. LEHMANN<sup>2</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Oxydation der Salpetrigen Säure durch Brom zu Salpetersäure:

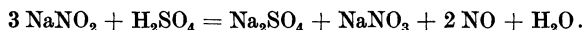


RUPP und LEHMANN schlagen dieses Verfahren zur Gehaltsbestimmung von Natriumnitrit vor; es dürfte aber auch zur Bestimmung von Nitrit in Pök- und Konservierungssalzen anwendbar sein. 10 ccm einer 0,5%igen Natriumnitritlösung — bei Pökelsalzen entsprechend mehr — versetzt man in einer Glasstöpselflasche mit 50 ccm titrierter 0,01 N.-Kaliumbromatlösung (1,6702 g Kaliumbromat im Liter<sup>3</sup>), 0,3—0,4 g Kaliumbromid und 50 ccm Wasser, säuert mit etwa 10 ccm verd. Schwefelsäure an, verschließt die Flasche sofort, schwenkt um und läßt die Flasche, vor Licht geschützt, 30 Minuten stehen. Darauf gibt man 0,5 g Kaliumjodid hinzu, schüttelt kräftig durch und titriert nach 2 Minuten das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung und Stärkelösung.

Da 50 ccm 0,01 N.-Kaliumbromatlösung 30 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung entsprechen, sind die zur Jodtitration verbrauchten Kubikzentimeter 0,1 N.-Thiosulfatlösung von 30 abzuziehen; die Differenz entspricht dem Nitritgehalt. 1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung = 0,00345 g  $\text{NaNO}_2$  = 0,0019 g  $\text{N}_2\text{O}_3$ .

### 4. Verfahren nach GROSSMANN.

Dieses Verfahren ist nach J. PELTZER<sup>4</sup> namentlich zur Bestimmung des Natriumnitrits in Pök- und Konservensalzen geeignet. Es beruht auf der Reaktion



10 g des Salzes werden in einem ERLLENMEYER-Kolben in etwa 150 ccm Wasser gelöst, die Lösung genau gegen Phenolphthalein neutralisiert, etwa 15 ccm 0,1 N.-Schwefelsäure und etwas Bimsstein hinzugegeben, und darauf wird so lange gekocht, bis die Stickstoffoxyde verschwunden sind; alsdann wird der Schwefelsäureüberschuß mit 0,1 N.-Lauge zurücktitriert. 1 ccm 0,1 N.-Schwefelsäure = 0,01035 g Natriumnitrit.

### 5. Aminosulfonsäure-Verfahren nach P. BAUMGARTEN und I. MARGGRAFF.

Das oben (S. 660) beschriebene Verfahren zum Nachweise von Salpetriger Säure und Salpetersäure kann auch zur Bestimmung der beiden Säuren nebeneinander verwendet werden.

<sup>1</sup> L. W. WINKLER: Z. 1915, 29, 10.

<sup>2</sup> E. RUPP u. F. LEHMANN: Arch. Pharm. 1911, 249, 214.

<sup>3</sup> Der Titer der 0,01 N.-Kaliumbromatlösung muß natürlich mittels Kaliumjodid und Thiosulfatlösung genau eingestellt werden.

<sup>4</sup> J. PELTZER: Chem.-Ztg. 1932, 56, 383. — Vgl. auch W. PLÜCKER: Z. 1934, 68, 187.

**Bestimmung der Salpetrigen Säure.** 100 ccm 0,1—0,2%ige neutrale Nitritlösung versetzt man in der Kälte mit einem geringen Überschuß 0,1 bis 2%iger Aminosulfonsäurelösung und behandelt, wie oben (S. 660) angegeben. Nach erfolgter Umsetzung verdünnt man auf 400—500 ccm, erhitzt zum Sieden, setzt eine Lösung von 0,2—0,5 g Ammoniumchlorid in 1 ccm konz. Salzsäure hinzu und fällt die Schwefelsäure mit 1%iger Bariumchloridlösung, die man in einem Guß zusetzt, worauf man, ohne länger stehen zu lassen, das Bariumsulfat abfiltriert. Bei Gegenwart von Salpetersäure fallen die Ergebnisse infolge Einschlusses von Bariumnitrat etwas zu hoch aus. Man kann statt dieses gewichtsanalytischen Verfahrens auch den bei der Umsetzung gebildeten Stickstoff gasvolumetrisch bestimmen.

**Bestimmung der Salpetersäure.** In dem Filtrat der Bariumsulfatfällung reduziert man die Salpetersäure durch Zusatz von Zink- oder Magnesiumspäne und etwas Essigsäure zu Salpetriger Säure, worauf man letztere in der obigen Weise durch Zusatz von Aminosulfonsäure zersetzt, die gebildete Schwefelsäure als Bariumsulfat ausfällt und in gleicher Weise wie oben bestimmt; auch hier kann man stattdessen den entweichenden Stickstoff gasvolumetrisch bestimmen und daraus die Salpetersäure berechnen.

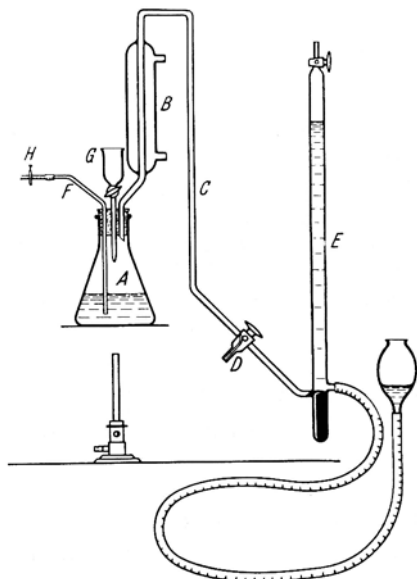


Abb. 10. Apparat zur Bestimmung der Salpetrigen Säure nach P. GERLINGER.

bunden. *D* ist ein Schwanzhahn, durch welchen das aus *A* entweichende Gas entweder ins Freie ausströmen oder nach *E* geleitet werden kann. Das Rohr *F* mit dem Quetschhahn *H* dient zum Einleiten der Kohlensäure.

Durch den Tropftrichter *G* wird die Nitritlösung (z. B. 100—300 ccm Harn<sup>3</sup>) in den Apparat eingesaugt.

Zunächst wird die Luft aus dem Apparat durch luftfreie Kohlensäure verdrängt, indem das Einleitungsrohr über der Ammoniumchloridlösung steht und diese erhitzt wird. Hierauf wird die Gasflamme entfernt, die Hähne *D* und *H* werden geschlossen und durch den entstehenden Minderdruck und gelegentliches Zuleiten von etwas Kohlensäure wird durch *G*, dessen enges Rohr vor Beginn des Versuchs mit Wasser gefüllt ist, die zu untersuchende Nitritlösung eingesaugt und *G* mit etwas Wasser nachgespült.

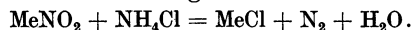
<sup>1</sup> F. GANTTER: Zeitschr. analyt. Chem. 1895, 34, 25. — Das Verfahren ist auch von J. GAILLAT (Journ. Pharm. Chim. 1900, (6) 12, 9; C. 1900, II, 397) empfohlen worden.

<sup>2</sup> P. GERLINGER: Zeitschr. angew. Chem. 1901, 14, 1250.

<sup>3</sup> Der Harnstoff wirkt dabei in gleicher Weise wie das Ammoniumchlorid auf das Nitrit.

## 6. Gasometrisches Verfahren nach F. GANTTER<sup>1</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Umsetzung von Nitrit mit Ammoniumsalzen nach der Gleichung:



P. GERLINGER<sup>2</sup> führt das Verfahren, das sowohl bei physiologischen Flüssigkeiten (z. B. Harn) als auch bei weniger verdünnten Nitritlösungen angewendet werden kann, in dem in Abb. 10 abgebildeten Apparat, wie folgt, aus:

Der Kolben *A* mit der gesättigten, vor dem Versuch ausgekochten Ammoniumchloridlösung ist durch *C* und *D* mit dem Azotometer *E* ver-

Die Flüssigkeit wird nun zum gelinden Sieden erhitzt und das aus *A* austretende Gemisch von Stickstoff und Kohlensäure in das mit Kalilauge gefüllte Azotometer *E* geleitet. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird der letzte Rest von Stickstoff durch erneutes Einleiten von Kohlensäure nach *E* getrieben.

Das auf Zimmertemperatur abgekühlte Volumen Stickstoff wird abgelesen, in der üblichen Weise auf 0° und 760 mm Druck reduziert und aus dem so erhaltenen Stickstoffvolumen das zersetzte Nitrit berechnet.

T. ZELLER<sup>1</sup> hat das Verfahren dadurch vereinfacht, daß er es in ein titrimetrisches Verfahren verwandelte. Er kocht eine passende Menge der Nitritlösung mit einer gemessenen Menge 3—4%iger Ammoniumchloridlösung von bekanntem Gehalt auf ein kleines Volumen ein und bestimmt darin das noch vorhandene Ammoniak durch Destillation mit Magnesiumoxyd. Die Differenz zwischen diesem und dem angewandten Ammoniak-Stickstoff entspricht dem vorhanden gewesenen Nitrit-Stickstoff.

Störend wirken auf die Bestimmung Ferrosalze und Carbonate; die Kohlensäure kann aber vor der Einkochung durch Fällung mit Bariumchlorid entfernt werden.

Soll auch der neben dem Nitrit-Stickstoff etwa vorhandene Nitrat-Stickstoff bestimmt werden, so füllt man den Rückstand von der Einkochung auf ein bestimmtes Volumen auf und bestimmt in einem aliquoten Teil den Nitrit-Stickstoff in der obigen Weise und in einem anderen aliquoten Teil den Salpeter-Stickstoff nach ULSCH (S. 656) oder nach einem anderen geeigneten Verfahren, wobei natürlich bei den Reduktionsverfahren das Rest-Ammoniak von der Einkochung mit der Nitritlösung zu berücksichtigen ist. W. STRECKER<sup>2</sup> empfiehlt die Überführung des Nitrattstickstoffs in Stickoxyd (S. 652).

### 7. Methylester-Verfahren nach W. M. FISCHER<sup>3</sup>.

Das Verfahren beruht auf der schnellen Esterbildung einwertiger Alkohole<sup>4</sup> durch Salpetrige Säure. Die Bestimmung der letzteren kann auf acidimetrischem oder jodometrischem Wege erfolgen.

**Acidimetrische Bestimmung.** Zu einer gemessenen Menge 0,1 N.-Salz- oder Schwefelsäure gibt man neutralen Methylalkohol und tropfenweise die zu untersuchende neutrale Nitritlösung und leitet durch die Flüssigkeit einige Minuten Luft hindurch. Hierauf wird der Überschuß der Säure mit 0,1 N.-Lauge gegen Phenolphthalein zurücktitriert.

**Jodometrische Bestimmung.** Die neutrale Nitritlösung wird mit überschüssigem Methylalkohol versetzt und nach Durchleiten von Kohlensäure soviel Säure zugegeben, bis  $p_H = 0,2—0,4$  beträgt. Der bei  $-12^\circ$  siedende Methylester der Salpetrigen Säure wird durch Kohlensäure in eine angesäuerte Kaliumjodidlösung übergetrieben, wo er sich unter Abscheidung von Stickoxyd und Jod zersetzt. Nachdem das Stickoxyd durch weitere Kohlensäuredurchleitung (im ganzen etwa  $\frac{3}{4}$  Stunden) vertrieben ist, wird das ausgeschiedene Jod mit Thiosulfatlösung titriert.

Ammoniumsalze, Bromide, Rhodanide, Chlorate, Jodate, Bichromate, Perchlorate, Formiate, Oxalate, Tartrate, Arsenite, Ferrisalze, Kaliumferricyanide und Harnstoff stören die Bestimmung nicht; dagegen versagt sie bei Gegenwart von Bromaten, Sulfiten, Ferrocyaniden, Permanganaten, Hydroxylamin, Hydrazin und Anilinsalzen, weil bei diesen die Einwirkung auf die Salpetrige Säure schneller erfolgt als die Esterbildung. Bei Gegenwart von Ferrosalzen ist die Zugabe von Kaliumbichromat erforderlich, um die Bildung von Eisen-Stickoxyd-Komplexen zu verhindern.

<sup>1</sup> T. ZELLER: Landw. Vers.-Stationen 1909, 70, 145; Z. 1911, 21, 227.

<sup>2</sup> W. STRECKER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1918, 51, 997.

<sup>3</sup> W. M. FISCHER u. N. STEINBACH: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1912, 78, 134. — W. M. FISCHER u. A. SCHMIDT: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1929, 179, 332.

<sup>4</sup> Das Verfahren kann daher auch zur Bestimmung einwertiger Alkohole dienen; vgl. den Abschnitt Alkoholbestimmung S. 985.

### 8. Colorimetrische Verfahren.

Diese Verfahren dienen meist zur Bestimmung geringer Mengen von Salpetriger Säure im Trinkwasser. Einige davon sind auch anderweitig verwendbar.

a) Verfahren mit Naphthylamin-Sulfanilsäure. Zur Bestimmung geringer Mengen Salpetriger Säure dient das oben (S. 661) angegebene Reagens. Man verfährt nach D. ACÉL<sup>1</sup>, wie folgt: 10 ccm kalte Nitritlösung werden mit 0,25 ccm konz. Essigsäure und 0,5 ccm des Reagens versetzt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur (20—25°) stehen gelassen. Darauf vergleicht man die Färbung mit Vergleichslösungen von bestimmten Nitritgehalten oder nach D. ACÉL mit entsprechenden Fuchsinlösungen.

H. BERGER<sup>2</sup> gibt zu 100 ccm einer Trinkwasserprobe 5 ccm Reagens und erwärmt die Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis auf etwa 60°. Er weist darauf hin, daß bei längerer Erwärmung auf 60° das Reagens eine Zersetzung erfährt und sich dabei schwach rosa färbt. Sehr starke Färbungen (10 mg/l N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) werden bald trübe. Die Gegenwart von Nitraten und Eisensalzen stört die Reaktion nicht. Die zu untersuchende Lösung und die Vergleichslösungen müssen gleiche neutrale Reaktion besitzen.

b) Verfahren mit Diphenylamin<sup>3</sup>. Zur Bestimmung geringer Mengen Salpetriger Säure dient das oben (S. 651, 662) angegebene Reagens; die Ausführung der Bestimmung geschieht in gleicher Weise, wie S. 662 angegeben ist. Die entsprechenden Vergleichslösungen stellt man mittels einer Lösung von 0,1816 g Natriumnitrit = 100 mg Salpetrige Säure in 1 Liter her, von der man Verdünnungen mit 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 mg Salpetriger Säure im Liter bereitet. Enthält die zu untersuchende Lösung (Wasser) mehr als 2,5 mg Salpetrige Säure, so verdünnt man sie entsprechend; sollen geringere Mengen bestimmt werden, so konzentriert man die zu untersuchende Lösung durch Eindampfen unter Zusatz von 1 Tropfen verd. Natronlauge.

c) Auch die Mehrzahl der oben (S. 663) angeführten sonstigen Verfahren zum Nachweis von Salpetriger Säure ist für deren colorimetrische Bestimmung im Trinkwasser vorgeschlagen worden.

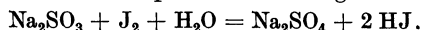
### 9. Nachweis und Bestimmung von Nitriten neben Sulfiten.

Präserve- und Pökelsalze enthalten gelegentlich Nitrite neben Sulfiten. In solchen Gemischen bietet der Nachweis und die Bestimmung beider Schwierigkeiten.

**Nachweis.** Nach E. SZABÓ<sup>4</sup> löst man das zu prüfende Salz in einer geringen Menge ausgekochtem Wasser, gibt etwas Natriumcarbonat hinzu, fällt die Schweflige Säure in der Kälte mit Bleiacetat- oder Bleinitratlösung als Bleisulfit aus und filtriert dieses ab. Der Niederschlag wird in wenig Wasser aufgeschwemmt und nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure mit Kaliumjodat-Stärkepapier auf Schweflige Säure geprüft.

Das Filtrat der Bleisulfitfällung wird unter Ansäuern mit Schwefelsäure mit Zinkjodid-Stärkelösung (S. 661) auf Salpetrige Säure geprüft.

**Bestimmung.** a) Nach E. SZABÓ. Das zu untersuchende Salz wird mit ausgekochtem und mit etwas Natriumbicarbonat versetztem Wasser gelöst, sofort mit 0,1 N.-Jodlösung im Überschuß versetzt und nach einiger Zeit<sup>5</sup> mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung der Jodüberschuß zurücktitriert. Der Jodverbrauch entspricht dem Sulfitgehalt.



Darauf wird die Lösung durch Durchleiten von Kohlensäure luftfrei gemacht, unter ständigem Einleiten von Kohlensäure mit verd. Schwefelsäure angesäuert — wozu in der Regel

<sup>1</sup> D. ACÉL: Z. 1916, 31, 332.

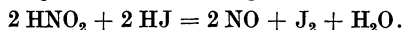
<sup>2</sup> H. BERGER: Z. 1920, 40, 225.

<sup>3</sup> J. TILLMANS u. W. SUTTHOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1911, 50, 473.

<sup>4</sup> E. SZABÓ: Z. 1930, 60, 389.

<sup>5</sup> Nach den Ergebnissen von W. PLÜCKER ist die Titration nach 5 Minuten zu empfehlen.

1 ccm 0,1 N.-Schwefelsäure genügen wird —, um das Jod in Freiheit zu setzen. Nach 2 Minuten titriert man unter ständigem Durchleiten von Kohlensäure und ohne das Becherglas zu bewegen, das frei gewordene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung. Das so gefundene Jod entspricht dem Nitritgehalt gemäß der Gleichung:



b) W. PLÜCKER<sup>1</sup> hält das von E. SZABÓ vorgeschlagene Verfahren der Sulfitbestimmung wegen der bei der Umsetzung mit Jod auftretenden Nebenreaktionen für nicht einwandfrei und empfiehlt folgende beiden Verfahren:

α) Verfahren mit Silbernitrat und Permanganat. Da bei der Oxydation des Sulfits durch Jod Jodwasserstoff entsteht und infolgedessen in derselben Lösung eine nachfolgende Bestimmung von Nitrit mit Permanganat nicht möglich ist, wohl aber, wenn man den Jodwasserstoff durch Silbernitrat entfernt, so verfährt man wie folgt:

10 ccm 0,1 N.-Jodlösung + 1,0 g Calciumcarbonat werden in einem 100 ccm-Kölbchen mit der Nitrit- und Sulfitlösung bis zum Verschwinden des Jodes titriert (Bestimmung des Sulfits). Darauf werden 12 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung zugegeben, umgeschüttelt, und der Überschuß an Silber durch Natriumchloridlösung fortgenommen; dann wird auf 100 ccm aufgefüllt, filtriert und in 50 ccm Filtrat mit Permanganat das Nitrit bestimmt.

β) Verfahren mit Permanganat und Jod. I. Man oxydiert zunächst das Sulfit in alkalischer Lösung und nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure das Nitrit in saurer Lösung mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung.

II. In einer anderen Probe bestimmt man wie bei α) den Sulfitgehalt mit 0,1 N.-Jodlösung und zieht den dem Jodverbrauch entsprechenden Permanganatverbrauch von dem Gesamtpermanganatverbrauch bei I. ab. Die Differenz entspricht dem Nitritgehalt.

W. PLÜCKER gibt auch ein Verfahren zur Bestimmung von Nitrit und Sulfit in zuckerhaltigen Präserve- und Pökelsalzen an. Man bestimmt in solchem Falle das Sulfit wie bei a und b mit Jodlösung und dann das Nitrit nach dem Verfahren von F. RASCHIG (S. 664).

<sup>1</sup> W. PLÜCKER: Z. 1934, 68, 187.

# Serologische Methoden zur Unterscheidung von Proteinen<sup>1</sup>.

Von

Professor **DR. C. GRIEBEL** - Berlin.

Mit 7 Abbildungen.

Die Unterscheidung von Proteinen verschiedener Tier- und Pflanzenarten sowie verschiedener Organe derselben Art ist bis zu einem gewissen Grade mit Hilfe bestimmter biologischer Verfahren, und zwar hauptsächlich durch Anwendung spezifischer Sera möglich. Solche spezifischen Sera erhält man, wenn man geeignete Tiere durch wiederholte Einspritzung der betreffenden Proteine vorbehandelt (immunisiert). Das Blutserum so behandelter Tiere enthält dann Stoffe gelöst, die nur mit Lösungen des zur Immunisierung verwendeten Proteins in bestimmter Weise reagieren, also eine spezifische Wirkung haben. Praktische Bedeutung für die Lebensmitteluntersuchung haben insbesondere die fälschend wirkenden spezifischen Sera erlangt, deren wirksame Stoffe als Präcipitine bezeichnet werden.

Die Präcipitine gehören zu den Antikörpern. So bezeichnet man zusammenfassend die Stoffe, die im Serum solcher Tiere entstehen, die durch Einspritzung bestimmter proteinartiger Substanzen (artfremder Proteine, Enzyme, lebender oder toter pathogener Bakterien, roter Blutkörperchen, Spermatozoen und anderer Körperzellen) gegen diese immunisiert worden sind. Die Antikörper wirken auf die sie erzeugenden Stoffe (Antigene) in verschiedenartiger aber spezifischer Weise ein. Für das Verständnis der Wirkungsweise der Antikörper ist zunächst eine kurze Darstellung ihrer allgemeinen Eigenschaften an dieser Stelle unerlässlich.

## I. Antikörper und ihre Eigenschaften<sup>2</sup>.

Von allen Antikörpern am besten bekannt sind die Antitoxine, an denen die ersten grundlegenden Untersuchungen ausgeführt wurden. Wir verdanken sie in erster Linie **EHRlich** und seinen Schülern, sowie **BEHRING**. Diese Untersuchungen haben **EHRlich** zur Aufstellung seiner genialen „Seitenkettentheorie“ geführt, die die Entstehung und Wirkungsweise nicht nur der Antitoxine, sondern auch der übrigen Antikörper in befriedigender Weise erklärt und die dadurch auf die Forschung außerordentlich fruchtbar gewirkt hat.

---

<sup>1</sup> Bearbeitet unter Benutzung des entsprechenden von **A. SPIECKERMANN** bearbeiteten Abschnittes der 4. Auflage von **KÖNIGS** Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Berlin: Julius Springer 1910.

<sup>2</sup> Von älteren Werken über die Antikörper gibt eine gute Übersicht **VON DUNGERN**: Die Antikörper 1903; **ASCHOFF**: **EHRlichS** Seitenkettentheorie. Zeitschr. allgem. Physiol. **1**, 69 (1902); die neuere sehr umfangreiche Literatur ist berücksichtigt in den betreffenden Abschnitten in **KOLLE, KRAUS** u. **UHLÉNTHUTH**: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl. Besonders in Betracht kommt der Abschnitt über Biochemie der Antigene und Antikörper von **PICK** u. **SILBERSTEIN** **2**, 1. Teil, 1929.

Auch neuere Arbeiten, die sich mit dem Problem des Wesens und der Entstehung der Antikörper befaßen, können kaum eine bessere Erklärung der Erscheinungen geben.

Die Antitoxine sind die Antikörper der Toxine, eigenartiger Giftstoffe, die von manchen pathogenen Bakterienarten (wie Diphtherie-, Tetanusbakterien), aber auch von höheren Pflanzen und Tieren erzeugt werden. Von den Pflanzen-Toxinen seien das Ricin, Abrin, Croton, Robin, von den tierischen Toxinen das Schlangen-, Skorpionen-, Spinnen- und Krötengift erwähnt. Die Toxine sind rein noch nicht dargestellt, vermutlich aber proteinartige, den Enzymen ähnliche, kolloidale Stoffe, die wie diese durch Wärme, Licht, Elektrizität, durch Verdauungsenzyme und Chemikalien leicht zerstört werden. Sie diffundieren durch tierische Membranen im allgemeinen nicht. Ihre kennzeichnendsten Eigenschaften sind eine strenge Spezifität, die sich in der Weise äußert, daß ein Toxin für gewisse Tierarten hochgradig, für andere aber nicht giftig ist, ein sog. Inkubationsstadium, das darin besteht, daß die Wirkung nicht sofort nach der Einverleibung des Toxins in den Körper, sondern erst nach einer bestimmten, kennzeichnenden, durch die Toxinmenge nicht wesentlich beeinflussbaren Zeit eintritt, und schließlich die Erzeugung von spezifischen Antitoxinen im Körper empfänglicher Tiere. Die Spezifität der Giftwirkung und das Inkubationsstadium der Bakterientoxine entsprechen ganz denjenigen der betreffenden lebenden Bakterien.

Wird in die Blutbahn eines empfänglichen Tieres Toxin eingeführt, so verschwindet es nach sehr kurzer Zeit daraus vollständig und ist auch weder in den übrigen Körperteilen noch in den Ausscheidungen nachzuweisen, sofern nicht übermäßige Mengen eingeführt worden sind. Die toxische Wirkung tritt aber erst nach Ablauf des Inkubationsstadiums zutage. Führt man dagegen Toxin in die Blutbahn unempfindlicher (natürlich immuner) Tiere ein, so kreist das Toxin tagelang im Blut unverändert, ohne daß eine Giftwirkung zu bemerken ist, und man hat die merkwürdige Erscheinung, daß man ein empfängliches Tier durch Impfung mit geringen Mengen Blut eines solchen gesund gebliebenen Tieres krank machen und töten kann. Diese Erscheinungen erklärt EHRlich durch die Annahme, daß die Toxine im Körper empfänglicher Tiere von dafür empfänglichen Zellen chemisch gebunden werden und erst hierdurch ihre Giftwirkung entfalten können. Wie man bei Benzolverbindungen von einem Kern spricht, der verschiedene Seitenketten trägt, so etwa stellt sich EHRlich auch den Aufbau des Protoplasmas vor mit einem „Leistungskern“ oder einer Zentralgruppe als Sitz des Lebens, während eine Reihe von Atomgruppierungen, die dem Kern angefügten Seitenketten, den vegetativen Funktionen (Ernährung usw.) dienen. Diese Seitenketten, die EHRlich auch Receptoren nennt, sind befähigt, sich mit verschiedenartigen in den Organismus gelangenden Stoffen chemisch zu verbinden. Durch sie geschieht auch die Bindung des Toxins an die Zellen. Es kann also Vergiftung durch Toxine nur eintreten, wenn im Organismus Receptoren mit spezifischer Affinität für das betreffende Toxin vorhanden sind. Fehlen solche Receptoren, so besteht natürliche Immunität.

Daß in der Tat die von EHRlich angenommene Bindung der Toxine durch empfindliche Zellen stattfindet, ist für das Tetanustoxin experimentell durch WASSERMANN nachgewiesen worden. Dieses auf das Zentralnervensystem wirkende Gift wird von der Zentralnervenssubstanz empfänglicher Tiere in großen Mengen, von der unempfindlicher Tiere nicht gebunden.

Den Bau der Toxine stellt sich EHRlich auf Grund dieser Befunde in der Weise vor, daß er in ihnen zwei spezifische Gruppen annimmt, eine haptophore, die eine spezifische Affinität zu den Receptoren der empfindlichen Zellen hat, und eine toxophore, die Trägerin der spezifischen Giftwirkung.



Wird nun ein empfängliches Tier durch wiederholte Einverleibung geringer, allmählich steigender Mengen eines Toxins gegen dieses immunisiert, so enthält sein Blutserum Stoffe, die Toxinlösungen nicht nur innerhalb des Körpers, sondern auch im Reagensglase entgiften. Diese Entgiftung ist aber keine Zerstörung des Toxins, denn es gelingt aus der neutralen Mischung von Cobratoxin-Antitoxin durch Säure- oder Alkalieinwirkung (MORGENROTH, SACHS) das Toxin wieder frei zu machen. Man kann also annehmen, daß Toxin und Antitoxin mittels spezifischer verwandter Atomgruppen neutrale Verbindungen nach Art eines Salzes eingehen, ohne daß dabei die Giftwirkung der toxophoren Gruppe zerstört wird. Weiter ist hieraus zu folgern, daß für die Antigen-Antikörperverbindungen im allgemeinen eine bestimmte H-Ionenkonzentration, die dem neutralen Medium entspricht, optimal ist.

Erwägt man die verschiedenen bei der Wirkung von Toxin auf Antitoxin zutage tretenden Umstände, so liegt die Annahme nahe, daß die Antitoxine in der Weise wirken, daß sie die spezifischen haptophoren Gruppen der Toxine durch entsprechende Gruppen besetzen, auf diese Weise die Verankerung der Toxine an die empfindlichen Zellen und dadurch auch die toxische Wirkung verhindern.

Die Entstehung dieser Antitoxine erklärt nun EHRLICH folgendermaßen: Wenn die Bindung zwischen der haptophoren Gruppe des Toxins und dem spezifischen Receptor der Zelle eingetreten ist, so ist diese Seitenkette physiologisch ausgeschaltet, und es wird dieser Defekt, da der Reiz ein spezifischer ist, von der Zelle durch eine Neubildung derselben Gruppe ersetzt werden (immer vorausgesetzt, daß die Toxinmenge zu gering war, um den Zelltod oder eine erhebliche Schädigung herbeizuführen). Im Verlauf des Immunisierungsverfahrens werden nun die die Receptoren liefernden Zellen gewissermaßen trainiert, die betreffende Seitenkette in immer ausgedehnterem Maße zu erzeugen, wobei eine Überkompensation die Regel ist. Bei systematischer Einführung immer größerer Giftdosen wird es daher endlich zu einem Punkte kommen müssen, bei dem ein solcher Überschuß an Seitenketten produziert wird, daß diese als unnützer Ballast an das Blut abgegeben werden. Nach dieser Auffassung stellen somit die Antikörper die im Übermaß erzeugten und deswegen abgestoßenen Seitenketten des Zellprotoplasmas dar. Die abgestoßenen Receptoren werden auch Haptine genannt.

Diese als „Seitenkettentheorie“ bekannte Vorstellung erklärt also sowohl die Entstehung der Antikörper als auch die Spezifität ihrer Funktion.

Eine gute Bestätigung findet die EHRLICHsche Seitenkettentheorie in dem Verhalten der sog. Toxoide, Stoffe, die aus den Toxinen durch allmähliche Veränderung der toxophoren Gruppe entstehen, die nicht mehr giftig sind, aber die haptophore Gruppe noch enthalten und daher genau wie die Toxine Antitoxin binden. Es entstehen nun bei der Immunisierung mittels dieser Toxoide entsprechend den Forderungen der Theorie in der Tat Antitoxine, die nicht nur die Toxoide, sondern auch die entsprechenden Toxine in streng spezifischer Weise binden.

Genau wie die Entstehung der Antitoxine stellt man sich auch die der anderen Antikörper vor. Sie sind durchweg abgestoßene Zellenreceptoren, sog. Haptine, vielleicht von komplizierterem Bau als die Antitoxine.

Eine zweite Gruppe der Antikörper bilden die Agglutinine und Präcipitine. Die Agglutinine (GRUBER und DURHAM) entstehen im Serum von Tieren, die mit lebenden oder durch vorsichtiges Erwärmen schonend getöteten Bakterien immunisiert worden sind. Versetzt man eine Abschwemmung einer jungen Agarkultur oder eine junge flüssige Kultur der betreffenden Bakterien mit einer Spur des Immunserums, so kommt die Bewegung der Bakterien zum

Stillstand und sie ballen sich zu kleineren und größeren Klumpen zusammen, die zu Boden sinken, so daß die Flüssigkeit klar wird. Bei der Agglutination wird das Agglutinin an die Bakterien gebunden. Die Agglutinine können durch verschiedene vorsichtige Eingriffe in Stoffe umgewandelt werden, die zwar wie sie noch in spezifischer Weise an die Bakterien gebunden werden, aber keine Agglutination mehr hervorrufen. Diese Stoffe werden Agglutinoide genannt. EHRLICH nimmt daher an, daß die Agglutinine zwei Funktionsgruppen enthalten, nämlich eine haptophore, die eine spezifische Verwandtschaft zu einer entsprechenden Gruppe des Bakterienleibes besitzt und eine zymophore (agglutinophore), die die Agglutination zustande bringt.

Auch tierische Zellen erzeugen im Serum mit ihnen behandelter Tiere Agglutinine. Besonders bemerkenswert sind die Hämagglutinine, die bei der Immunisierung mit artfremdem Blute entstehen.

Die Bakterien-Agglutinine spielen eine wichtige Rolle bei der Differentialdiagnose verwandter pathogener Bakterienarten.

Denselben Aufbau, wie für die Agglutinine, nimmt man für die Präcipitine an. Diese Antikörper hat KRAUS entdeckt. Kurz nach der Entdeckung der Agglutination durch GRUBER und DURHAM wies er nach, daß das Serum gegen pathogene Bakterien immunisierter Tiere auch Stoffe enthält, die in zellfreien Filtraten flüssiger Kulturen dieser Bakterien spezifische Niederschläge erzeugen. Später haben BORDET, TSCHISTOWITSCH, WASSERMANN und SCHÜTZE solche Antikörper auch bei der Immunisierung mit artfremden Proteinen verschiedenster Art erhalten. Auch hier kennt man Präcipitoide, die zwar noch an die entsprechenden Proteine gebunden werden, aber sie nicht mehr fällen. Man nimmt daher auch in den Präcipitinen eine haptophore und eine zymophore (präcipitophore) Gruppe an.

Die Präcipitine sind von großer Bedeutung für die bakteriologische Diagnostik, die Unterscheidung von Proteinen, für Fragen der Ernährungsphysiologie (Proteinverdauung usw.) und für biologische Probleme (Verwandtschaft der Arten).

Wohl noch komplizierter ist der Bau bei einer dritten Gruppe von Antikörpern, den Lysinen. PFEIFFER entdeckte zuerst, daß das Serum gegen Cholera oder Typhus immunisierter Tiere die betreffende Bakterienart innerhalb des Tierkörpers auflöst. BORDET wies dann nach, daß diese „bactericide“ oder „bakteriolytische“ Wirkung des Serums sich unmittelbar nach der Entnahme aus dem Körper auch im Reagensglase entfaltet, daß es dieselbe beim Erwärmen auf 56° verliert, sie durch Zusatz von frischem normalen Serum aber wieder gewinnt („Inaktivierung“ und „Reaktivierung“ des Serums). BORDET entdeckte weiter, daß auch bei der Immunisierung mit defibriertem Blut ein Immunserum erhalten wird, das im Reagensglase die Zellwand der Blutkörperchen in der Weise verändert, daß der Blutfarbstoff in die umgebende Flüssigkeit tritt (Hämolyse), und das ebenfalls bei 56° inaktiviert und durch Zusatz von frischem Normalserum reaktiviert wird.

EHRLICH erklärt diese Vorgänge in folgender Weise: Bei der Bakterio- und Hämolyse wirken zwei Stoffe, nämlich der in dem Immunserum enthaltene thermostabile Antikörper (Immunkörper, Amboceptor) und ein im Immun- und im normalen Serum enthaltener thermolabiler Körper, das Komplement. Man nimmt an, daß die Normalsera verschiedene Komplemente enthalten, die bei verschiedenen Tierarten zum Teil identisch sind.

Der Immunkörper besitzt nach EHRLICH zwei haptophore Gruppen, von denen die eine eine Affinität zu den entsprechenden Receptoren der Bakterien oder Blutkörperchen, die andere eine solche zu den Komplementen hat. Die Wirkung der Lysine (Bakteriolysine, Hämolysine) kommt also in der

Weise zustande, daß der Immunkörper sich mit einer haptophoren Gruppe an die Bakterien- oder Blutkörperzelle, mit der anderen an das Komplement verankert und daß dieses nun die Lösung bewirkt. Fehlt das Komplement, so erfolgt zwar Bindung, aber keine Auflösung.

Der komplizierte Vorgang der Zytolyse wird durch einen Überreichtum der Nomenklatur dem Fernerstehenden noch schwerer verständlich. Die häufigsten Synonyma sind für den thermostabilen Körper: Immunkörper,

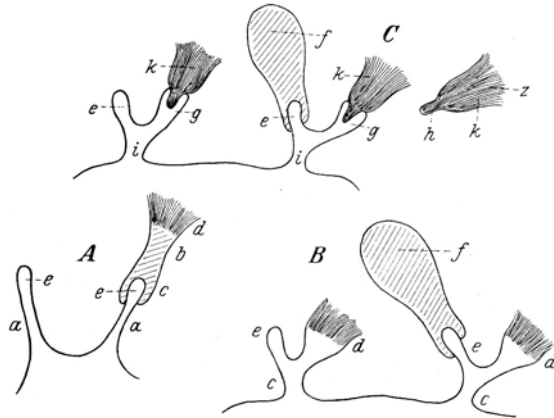


Abb. 1. Schematische Darstellung der Rezeptoren nach EHRlich. *A* Rezeptoren 1. Ordnung (*a*): *e* haptophorer Komplex, *b* aufgenommenes Toxinmolekül mit haptophorer (*c*) und toxophorer (*d*) Gruppe. *B* Rezeptoren 2. Ordnung (*e*) mit haptophorer (*g*) und zymophorer (*h*) Gruppe. Aufgenommenes Nährmolekül *f*. *C* Rezeptoren 3. Ordnung (*i*): *e* haptophore Gruppe, *g* komplementophile Gruppe, *k* Komplement mit haptophorer (*h*) und zymotoxischer (*l*) Gruppe, *f* aufgenommenes Nährstoffmolekül.

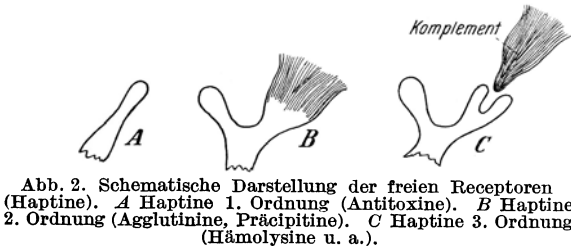


Abb. 2. Schematische Darstellung der freien Rezeptoren (Haptine). *A* Haptine 1. Ordnung (Antitoxine). *B* Haptine 2. Ordnung (Agglutinine, Präcipitine). *C* Haptine 3. Ordnung (Hämolyse u. a.).

der Körpersäfte nicht ohne weiteres zerstört werden können, in den Machtbereich des abbauenden und aufbauenden Protoplasmas. Nur werden die Rezeptoren der Proteine vermutlich erheblich komplizierter sein als z. B. die der Toxine und zugleich enzymartige Gruppen enthalten.

EHRlich unterscheidet die Rezeptoren und Haptine als solche 1., 2. und 3. Ordnung. Danach ergibt sich für die Haptine folgende Einteilung:

1. Ordnung: Antitoxine und Antienzyme mit einer haptophoren Gruppe.
2. Ordnung: Agglutinine und Präcipitine mit einer haptophoren und einer zymophoren Gruppe.
3. Ordnung: Zytotoxine (Bakteriolysine, Hämolyse u. a.) mit zwei haptophoren und einer toxophoren (lytischen) Gruppe.

Die Haptine 1. und 2. Ordnung werden als Uniceptoren (mit einer haptophoren Gruppe) zusammengefaßt; die der 3. Ordnung heißen Amboceptoren.

Die schematische Darstellung in Abb. 1 und 2 wird das Verständnis des Aufbaues und der Entstehung der Antikörper wesentlich erleichtern.

Amboceptor, Sensibilisator, für den thermostabilen Körper: Komplement, Addiment, Alexin. Ebenso wie mit Blutkörperchen lassen sich mit anderen Körperzellen lytische Sera herstellen, deren Antikörper (in Verbindung mit den Komplementen) allgemein als Zytotoxine bezeichnet werden.

Hämolytische Systeme finden bei der Methode der Komplementablenkung (S. 700) Verwendung, die ebenfalls zur Unterscheidung von Proteinen dienen kann.

EHRlich nimmt an, daß die Bindung komplizierter Moleküle an die Rezeptoren der Zelle und die Erzeugung der Antikörper ein Vorgang des normalen Zellebens ist, der auch bei der Resorption der Proteine eine große Rolle spielt. Erst durch die Bindung an Rezeptoren gelangen die Stoffe, die durch die Enzyme

Erwähnt seien schließlich die sog. heterogenetischen Antikörper, die bei dem unter VI. (S. 702) genannten Verfahren eine Rolle spielen. In neuerer Zeit hat FORSSMAN festgestellt, daß durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Organeiweiß von Meerschweinchen oder Pferden Hämolytine gegen Hammelblutkörperchen entstehen („Heterogenetische Antikörper“), eine Beobachtung, die zu einer gewissen Einschränkung der Spezifität in der Immunitätsforschung geführt hat. Diese Untersuchungen über die hämolytischen Antikörper FORSSMANS sind von FRIEDBERGER und seinen Schülern auch auf die Präcipitine ausgedehnt worden. Nach den Untersuchungen von MANTEUFEL und BEGER entstehen aber solche „heterogenetischen Präcipitine“ im Sinne von FORSSMAN bei der Immunisierung von Kaninchen mit artfremdem Protein überhaupt nicht, so daß die Proteindifferenzierung mit Hilfe der Präcipitinreaktion, die vorläufig als einzige serologische Methode für die Nahrungsmitteluntersuchung praktisch in Betracht kommt, hierdurch nicht beeinträchtigt werden kann.

## II. Präcipitine<sup>1</sup>.

Die zur Bildung dieser Antikörper verwendeten Antigene werden nach der von KRAUS eingeführten Nomenklatur Präcipitinogene, die gebildeten Antikörper selbst Präcipitine (Zoo- und Phytopräcipitine) genannt. Werden Präcipitinogen und Präcipitin gemischt, so entsteht ein Niederschlag, das Präcipitat.

### 1. Präcipitin erzeugende Stoffe (Präcipitinogene).

Unter Präcipitinogenen versteht man alle Antigene tierischen oder pflanzlichen Ursprunges, die im tierischen Organismus die Produktion von spezifischen Präcipitinen auslösen. In erster Linie gilt dies für die artfremden genuinen Proteine, d. h. für die Proteine in dem Zustande, in dem sie im Körper enthalten sind, oder wie sie durch wenig eingreifende Verfahren (z. B. durch Aussalzen) erhalten werden. Meist werden natürliche (seltener künstliche) Lösungen von Proteinen (wie Serum, Lymphe, Fleischpreßsaft u. dgl.) zur Präcipitinerzeugung verwendet, doch gelingt die Präcipitinbildung zuweilen auch mit nicht gelösten Proteinen. Diese müssen dann allerdings soweit löslich sein, daß sie für die Körperzellen oder die gelösten Fermente angreifbar sind, also mit den Zellen in Reaktion treten können. MANTEUFEL und BEGER haben versucht durch Verwendung von Alkoholpräcipitaten aus Fleischauszügen streng spezifische und zugleich haltbare Antigene zu erzielen.

Von reinen Proteinen haben OBERMEYER und PICK krystallisiertes Edestinglobulin, LEVENE krystallisiertes Hämoglobin, GIDEON, WELLS, sowie OSBORNE und WELLS krystallisiertes Eiereiweiß, Edestin und andere krystallisierte Pflanzenproteine (wie Globuline aus Ricinus-, Kürbis- und Flachssamen) in Lösung mit Erfolg verwendet. Nach öfterem Umkrystallisieren soll Eieralbumin seine präcipitinbildende Eigenschaft verlieren.

Die Frage, ob die präcipitinogenen Stoffe mit den Proteinen identisch oder nur eng verbunden sind, ist immer noch nicht restlos geklärt. Jedenfalls haben neuere Untersuchungen gezeigt, daß Lipide bei der Antikörperbildung vielfach eine erhebliche Rolle spielen. So konnten PICK und SCHWARZ mit Pferdeserumlipoid spezifische Präcipitine erzeugen. Sie nehmen daher an, daß in Lipoiden gelöste Proteine, die sich in ihrem Charakter geändert haben

<sup>1</sup> Eine zusammenfassende Darstellung über Präcipitine findet sich bei DOLD in E. ABDERHALDEN: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 13, 2. Teil, H. 1. 1921. Weiteren Aufschluß geben die betreffenden Abschnitte in KOLLE, KRAUS, UHLENHUTH: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl.

(Alkohollöslichkeit, Thermoresistenz) antigen wirken. Nach PICK und SILBERSTEIN muß nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse zwischen Vollantigenen und unvollkommenen Antigenen unterschieden werden. Die ersteren rufen im Tierkörper die Bildung spezifischer Antikörper hervor, mit denen sie auch zu reagieren vermögen. Ihre Proteinnatur kann als feststehend gelten. Die letzteren zeigen zwar mit Antikörpern spezifische Bindungsreaktionen, sie sind aber nicht imstande selbst immunisierend zu wirken, bedürfen vielmehr der Mitwirkung von geeigneten Proteinen, die als „Schlepper“ fungieren. LANDSTEINER bezeichnet diese unvollkommenen Antigene, die wohl vorwiegend Körper lipoider Natur sind, als Haptene. Zu erwähnen sind auch noch die von AVERY und HEIDELBERGER aus Bakterien hergestellten eiweißfreien „Restantigene“, die mit homologem Immuserum Fällungen gaben und nach Angabe der genannten Autoren aus Polysacchariden bestanden.

Für die Vollantigene scheint immerhin jetzt die Protein- und Kolloidnatur festzustehen — auch krystallisierte Proteine haben in ihren Lösungen Kolloidcharakter — jedoch ist nicht jedes Proteinkolloid ein Vollantigen: so ist z. B. Gelatine nicht befähigt, Antikörperbildung hervorzurufen.

Mit der Proteinnatur der Vollantigene steht die Tatsache im Einklang, daß sie gegen tiefergreifende Einwirkung proteolytischer Fermente wenig oder gar nicht widerstandsfähig sind. Sowohl die peptischen als auch die tryptischen Abbauprodukte der Proteine liefern keine Präcipitine mehr. In den wenigen Fällen, in denen eine Immunisierung mit den Produkten partieller tryptischer Verdauung gelungen ist, muß nach PICK und SILBERSTEIN angenommen werden, daß lediglich die noch vorhandenen intakten Proteinreste die Antikörperbildung, vielleicht in Zusammenhang mit Haptenen, bewirkt haben. Auch bei der Autolyse der Proteine scheinen die antigenen Eigenschaften mehr oder weniger schnell verloren zu gehen.

Werden die Präcipitinogene unter dem Einfluß physikalisch-chemischer Faktoren derart verändert, daß sie ihre Flockbarkeit einbüßen, ohne eine Schädigung der spezifischen Bindungsfähigkeit für das Präcipitin zu erleiden, so bezeichnet man sie als Präcipitoide (der präcipitogenen Substanz<sup>1</sup>).

Ein derartiges Verhalten konnte z. B. EISENBERG bei verdünntem Hühnerprotein feststellen, das 1 Stunde auf 78° erhitzt worden war. Dieses inkoagulable Hühnerprotein vermochte die Ausflockung durch Präcipitin zu verhindern. Gleiche Beobachtungen machten OBERMAYER und PICK bei gekochtem (nicht koagulierte) Serum.

Eine auf Grund physikalischer und chemischer Zustandsänderungen des Moleküls entstandene Spezifität bezeichnen OBERMAYER und PICK als „Zustandspezifität“. So konnten die genannten mit erhitztem, aber durch Verdünnen mit Wasser vor irreversibler Koagulation geschütztem artfremdem Protein (Serum), das mit gewöhnlichen Präcipitinen keine Fällungen mehr gab, Antisera (Koktopräcipitine) herstellen, die erhitztes Serumprotein ebenso stark präcipitierten als unverändertes, während mit nativem Protein hergestellte Sera mit erhitzten Antigenen nicht oder nur sehr wenig reagieren. Diese Beobachtungen wurden von W. A. SCHMIDT bestätigt, der fand, daß 1/2 Stunde auf 70° erhitztes Pferdeserum spezifische Präcipitine erzeugt, die sowohl natives, wie auf 70° und sogar auf 100° erhitztes Serum fällen, und zwar viel energischer als durch Nativserum erzeugte Präcipitine.

Ein besonderes Verhalten zeigen die Milchproteine, die auch nach längerem Kochen ihre präcipitinogene Kraft behalten.

<sup>1</sup> Auch die in analoger Weise veränderten Präcipitine werden als Präcipitoide bezeichnet.

Die Wirkung von Alkalialbuminaten und Acidalbuminen ist der von erhitzten Proteinen zu vergleichen, auch sie erzeugen nach OBERMAYER und PICK art-spezifische Präcipitine mit „größerer Reaktionsbreite“.

OBERMAYER und PICK konnten weiter zeigen, daß jodierte, diazotierte und nitrierte, also durch stärkere chemische Eingriffe veränderte Proteine Präcipitine erzeugen, bei denen die Artspezifität verschwunden ist. Die genannten schließen hieraus, daß die artspezifische Gruppierung im Proteinmolekül in der Hauptsache von Gruppen beeinflußt wird, die mit dem aromatischen Kern des Proteins zusammenhängen. Sie bezeichnen die die Arteigenheit des Proteinantigens bedingende Spezifität als originäre Spezifität.

PICK und SILBERSTEIN kommen zu dem Gesamtergebnis, daß die Spezifität der Antigene von chemischen Gruppen in bestimmter Stellung innerhalb des Moleküls also vom struktur-chemischen Aufbau (konstitutive Spezifität), die Fähigkeit Antikörperbildung hervorzurufen und mit den gebildeten Immunkörpern zu reagieren, dagegen vorwiegend von physikalisch-chemischen Eigenschaften des Vollantigens abhängig ist.

## 2. Präcipitinbildung im Körper.

Präcipitine entstehen nur, wenn die Antigene unter Umgehung des Verdauungskanaals in den Kreislauf gelangen. Gleichgültig ist es, ob dies subcutan, intravenös oder intraperitoneal geschieht. Nur unter abnormen Bedingungen (direkte Einführung in den Darm, Überfütterung, pathologische Verhältnisse) treten die Proteine unverändert durch die Darmwand und erzeugen im Serum Präcipitine<sup>1</sup>.

In den ersten Tagen nach der Injektion ist das Antigen im Blut in stets abnehmender Menge nachzuweisen. Nach etwa 5 Tagen ist es verschwunden und erst jetzt ist Präcipitin vorhanden, dessen Bildung am 7. bis 8. Tag ihr Maximum erreicht. Allmählich geht dann der Präcipitingehalt wieder zurück.

Eine Beziehung zwischen der Menge der eingeführten Proteine und dem Präcipitingehalt scheint nicht zu bestehen.

Zur Bildung von Präcipitinen sollen nach v. DUNGERN u. a. nur höhere Wirbeltiere imstande sein. Dagegen will NOGUCHI auch in Kaltblütern solche erzeugt haben.

Die Bildungsstätte der Präcipitine ist unbekannt. Nach KRAUS und SCHIFFMANN dürfte sie je nach der Art der Einwirkung des Antigens verschieden sein. Nach peritonealer Injektion von Protein läßt sich Präcipitin im Blutserum und im Extrakt des Netzes nachweisen, nach subcutaner oder intravenöser Injektion nur in der Blutbahn. Es ist daher anzunehmen, daß die Präcipitine von den Leukocyten und auch von den Endothelien der Blutgefäße gebildet werden.

## 3. Eigenschaften und Spezifität der Präcipitine.

Eine Reindarstellung von Präcipitinen ist bisher nicht möglich gewesen, da sie von den Proteinen des Serums nicht getrennt werden konnten. Nach den Untersuchungen von PICK u. a. kann man durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfatlösung die Präcipitine aussalzen. Sie finden sich hierbei in der Globulinfraktion.

Alle Eingriffe, die das Protein verändern, schädigen auch die Präcipitine. Von Chemikalien erwiesen sich nach PICK z. B. Alkalien, Säuren, konz. Harnstofflösung, Formaldehyd schädlich. Durch Pepsin werden sie schnell, durch

<sup>1</sup> Auch das Blut nicht immunisierter Tiere enthält oft geringe Mengen verschiedener Präcipitine. Andere Antikörper (Antitoxine, Agglutinine, Hämolytine) kommen gleichfalls in geringer Menge im normalen Serum vor.

Trypsin langsamer in dem Maße zerstört, wie die Menge des koagulierbaren Proteins abnimmt.

Getrocknetes Präcipitin kann nach EISENBERG  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $100^{\circ}$  erhitzt werden, ohne eine Schädigung zu erleiden. Erst beim Erhitzen auf  $130^{\circ}$  wird, analog der Denaturierung der Proteine, auch die Wirkung des trockenen Präcipitins vernichtet. Dagegen verlieren Präcipitinlösungen im allgemeinen schon beim Erhitzen über  $70^{\circ}$  ihre Wirksamkeit. Wie KRAUS, v. PIRQUET u. a. beobachteten, gehen beim Erhitzen auf  $50-70^{\circ}$  nur die fallenden Eigenschaften des Präcipitins verloren, während die spezifisch bindende Eigenschaft gegenüber der präcipitablen Substanz des Antigens erhalten bleibt. Man bezeichnet diese inaktive Form der Präcipitine, bei der die präcipitophore Gruppe zerstört, die haptophore erhalten ist, als Präcipitoide. Die Präcipitoide können sogar die Fällung durch nachträglich zugesetztes aktives Präcipitin verhindern.

Die Wirkung der Präcipitine ist entsprechend ihrer Eigenschaft als Antikörper eine spezifische, aber nur mit gewissen Einschränkungen.

Zunächst besteht eine biologische Spezifität, die Artspezifität, insofern als ein Präcipitin am stärksten auf die Proteine derselben Tierart wirkt (homologe Fällungen). Indessen treten auch Fällungen mit Proteinen anderer Tiere, insbesondere nahe verwandter Arten auf (heterologe Fällungen). Dies ist leicht verständlich, wenn man annimmt, daß die Präcipitine aus zahlreichen Haptinen (Partialpräcipitinen) bestehen und daß andererseits die Proteine der Tierarten eine gewisse Zahl gleicher Receptoren besitzen, die mit der Nähe der Verwandtschaft steigt.

Deshalb wird die Reaktion mit fortschreitender Verdünnung um so spezifischer, zumal nach Ausfällung der heterolog übergreifenden Partialantikörper (vgl. S. 688), und in stark verdünnten Serumlösungen wirken die Präcipitine streng spezifisch. Nur bei sehr nahe verwandten Arten, wie Pferd und Esel, Hund und Fuchs, Hammel, Ziege und Rind, Schwein und Wildschwein, Mensch und Affe läßt sich überhaupt keine sichere Unterscheidung herbeiführen. In manchen Fällen gelingt dies, wie UHLENHUTH nachwies, wenn man die Antisera nicht wie gewöhnlich an Kaninchen, sondern durch „kreuzweise Immunisierung“ von den betreffenden Tierarten selbst herstellt. So fällt ein vom Affen gewonnenes Menschenantiserum wohl Menschen-, nicht aber Affenserum, während ein vom Kaninchen gewonnenes Menschenantiserum beide fällt. In ähnlicher Weise kann man Kaninchen- und Hasen-, Tauben- und Hühnerserum unterscheiden. Bei anderen Arten aber (Pferd und Esel, Hammel und Ziege) versagt das Verfahren. Über die Bedeutung dieser Verwandtschaftsreaktionen für die Praxis vgl. S. 688.

Neben der für unsere Zwecke besonders wichtigen Art-Spezifität existiert aber auch eine Organ-Spezifität. Das heißt, es lassen sich in verschiedenen Organen neben Antigenen, die auch dem Blutserum eigen sind, zugleich andere organspezifische Antigene nachweisen; man kann also unter günstigen Umständen mit entsprechenden Präcipitinen verschiedene Proteine desselben Individuums differenzieren.

Letzteres hatte UHLENHUTH bereits 1900 durch die Unterscheidung der Proteine der Vogelei gezeigt. Mit einem Dotterantiserum trat nämlich noch in einer Dotterlösung 1 : 4000 eine Reaktion auf, während Eiklarlösungen auch bei Konzentrationen 1 : 50 vollständig klar blieben.

Das Hühner-Dotter-Antiserum ruft allerdings auch in einer Hühner-Blutlösung eine wenn auch erheblich geringere Trübung hervor. Andererseits wird durch Hühner-Dotter-Antiserum auch Enten- und Gänседotter in erheblichem Maße, Taubendotter schwächer präcipitiert. Bei Eiklar treten solche

übergreifenden Reaktionen nach GRÄTZ nicht ein. Eiklar besitzt also Art-spezifität, Dotter Organspezifität.

Noch deutlicher kommt die Organspezifität bei der Krystallinse zum Ausdruck. Die Krystallinse des Auges ist das einzige tierische Protein, das mit einem Blut-antiserum keine Reaktion gibt (UHLENHUTH). Es nimmt also eine Sonderstellung ein, was darauf zurückzuführen ist, daß die Linse keine Blutgefäße hat und daher auch kein Serumprotein enthält. Das Linsenprotein, das serologisch auch vom Protein des Glaskörpers verschieden ist, ist zugleich organspezifisch fast für die ganze Tierreihe; denn Linsen-Proteinlösungen von Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien werden gleich stark von Augenlinsen-Antiserum präcipitiert, während bei den Fischen nur noch eine geringe Reaktion bemerkbar ist. Als weitere Beispiele für Organspezifität seien noch folgende erwähnt:

KLEIN fand, daß Präcipitine, die durch Erythrocyten-Extrakte aus gewaschenen Blutkörperchen gebildet waren, nur in den Erythrocyten-Extrakten der gleichen Tiergattung Niederschläge hervorriefen, während die Serum-Präcipitine im allgemeinen nur für Serum spezifisch waren, was von UHLENHUTH und WEDANZ bestätigt werden konnte. Bei Verwendung von Hämoglobin als Antigen konnten HEIDELBERGER und LANDSTEINER, HEKTOEN und SCHULHOF sowie andere Forscher feststellen, daß die Antihämoglobinsera die gleiche Artspezifität und die gleichen Verwandtschaftsreaktionen aufweisen wie Antisera gegen Blutserum-Protein, daß sich aber Hämoglobin und Serum der gleichen Art auf diese Weise scharf unterscheiden läßt.

Organspezifische Präcipitine ließen sich auch gegen Leukocyten und Leukocyten-Extrakte (HEKTOEN und MENNE), gegen die Schleimhaut des Magens (HEKTOEN und SCHULHOF), sowie gegen verschiedene Glucoproteine (Chondromucoid aus dem Knorpel-septum des Rindes, Mucin aus der Submaxillardrüse des Rindes usw.) herstellen.

PFEIFFER hat mit Spermatozoen des Rindes Antisera erhalten, die Spermalösungen und Hodenextrakte in gleicher Stärke, heterologe artgleiche Extrakte dagegen gar nicht oder nur schwach (besonders Nierenextrakt) präcipitierten, im letzteren Fall durch elektive Absättigung aber zu hochspezifischen gemacht werden konnten. Diese Ergebnisse wurden in neuerer Zeit durch HEKTOEN und seine Mitarbeiter sowie andere Forscher bestätigt.

Aus allen diesen Befunden ergibt sich mithin, daß die durch Injektion verschiedener Zellenextrakte der gleichen Tierart entstehenden Präcipitine voneinander verschieden sind, so daß sie die Unterscheidung dieser Extrakte ermöglichen. Während die Serumpräcipitine nur artspezifisch sind, besitzen die Extrakte bestimmter Zellarten daneben noch eine Spezifität des Organs oder der Funktion. Die Artspezifität tritt bei solchen Präcipitinen gegenüber der Organspezifität um so mehr zurück, je spezifischer die Funktion und je differenter daher die Proteine des betreffenden Organs sind.

Das prägnanteste Beispiel hierfür ist das Augenlinsen-Antiserum UHLENHUTHS. Daß es bisher nur mit einer beschränkten Anzahl von Organen gelungen ist entsprechende Präcipitine zu erzeugen, erklärt sich ohne weiteres dadurch, daß es eben nach den bis jetzt zur Verfügung stehenden Methoden vielfach nicht möglich ist, die Serumproteine abzutrennen und spezifische Organproteine zu isolieren; denn fast bei allen serologischen Versuchen mit Organen arbeitet man mit einem Komplex von Antigenen.

Leichter gelingt eine solche Isolierung bei Pflanzenproteinen, die sich oft in reiner, nicht selten krystallisierter Form abscheiden lassen. So konnten WELLS, OSBORNE u. a. nachweisen, daß das aus Wicken, Linsen, Bohnen abge-schiedene Legumin serologisch wie chemisch ein einheitlicher Körper war. Ebenso erwies sich Globulin aus Kürbissen und Melonen als identisch. Das Gliadin des Weizens stimmte mit dem Gliadin des Roggens chemisch und serologisch überein und zeigte serologisch mit dem Hordein der Gerste nahe Verwandtschaft und große Ähnlichkeit im chemischen Bau, während das Glutenin der Weizenkörner davon chemisch und serologisch deutlich verschieden war. Es entspricht also der verschieden großen Ähnlichkeit im chemischen Aufbau ein entsprechendes serologisches Verhalten. In Verbindung mit den Beobachtungen von OBERMAYER und PICK über die Bedeutung der aromatischen Gruppen in den Antigenen für den Immunisierungsprozeß ist hieraus zu schließen, daß die Spezifität eines Proteins und damit auch des betreffenden Präcipitins nicht vom ganzen Molekül abhängt, sondern lediglich von bestimmten Gruppen oder Radikalen innerhalb des Moleküls (WELLS, PICK).



#### 4. Entstehung der Präcipitate und ihre Eigenschaften.

Präcipitate entstehen im Reagensglas unter bestimmten Bedingungen; im Körper ist ihre Bildung nicht nachgewiesen. Bei der Präcipitatabildung werden Präcipitin und Präcipitinogen verbraucht, allerdings nur unter optimalen Verhältnissen.

Die Niederschlagsbildung hängt von den Mengenverhältnissen der an der Reaktion beteiligten Faktoren ab. Werden gleiche Mengen Präcipitin mit steigenden Mengen präcipitabler Stoffe gemischt, so wächst die Menge des Präcipitats bis zu einem Optimalpunkt, dann nimmt sie wieder ab und bei einem starken Überschuß des Antigens entsteht kein Niederschlag mehr, ein bereits entstandener kann sogar wieder in Lösung gehen. Bei gleicher Präcipitinogenmenge und steigendem Präcipitinzusatz findet zunächst eine stetige Zunahme des Niederschlages statt, die jedoch nicht proportional steigt, sondern ein Maximum erreicht. Daher wechselt die Zusammensetzung des Präcipitates je nach dem Verhältnis der beiden Reaktionskomponenten. Die Ansichten über die Herkunft der Fällungen gehen im übrigen auseinander, doch hat sich die Annahme, daß der Niederschlag aus konstanten Anteilen beider Komponenten bestehe, nach DUNGERN und anderen Autoren als nicht zutreffend erwiesen, vielmehr scheint das Präcipitin die Hauptmenge des Präcipitates zu liefern.

Auf die Entstehung der Präcipitate ist die Reaktion des Mediums von erheblichem Einfluß. Günstig ist die neutrale Reaktion, schwach saure (organische Säure oder saures Salz) beschleunigt die Fällung. Geringer Überschuß von anorganischen Säuren oder Laugen verhindert sie.

Zum Zustandekommen der Fällung ist das Vorhandensein von Salzen (Elektrolyten) notwendig. Durch höhere Temperaturen ( $37^{\circ}$ ) wird das Eintreten der Fällung beschleunigt. Überhaupt bestehen zwischen der Ausflockung der Kolloide und der Präcipitation weitgehende Analogien. Jedoch läßt sich die ganze Erscheinung nicht durch physikalische Kräfte allein erklären, vielmehr müssen auch spezifisch chemische Affinitäten angenommen werden.

Die Präcipitate sind löslich in verdünnten Säuren und Alkalien, unlöslich in Mineralsalzen. Eine spezifische Fällungshemmung kann durch die schon erwähnten Präcipitoide oder durch einen Überschuß an Präcipitinogen verursacht werden. Auch Antipräcipitine, die für Serumpräcipitin und Lactoserum beschrieben sind (KRAUS und EISENBERG), verhindern die Fällung.

### III. Nachweis und Differenzierung von spezifischen tierischen und pflanzlichen Proteinen mit Hilfe präcipitierender Antisera<sup>1</sup>.

In den Präcipitinen haben wir ein Mittel, ganz allgemein tierische sowie pflanzliche Proteine zu differenzieren, was mit Hilfe rein chemischer Methoden

<sup>1</sup> Zusammenfassende Darstellungen bieten: UHLENHUTH-WEIDANZ: Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909. — DOLD: Die Präcipitine und die Methoden der Präcipitation, in E. ABDERHALDEN: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, 1921, Abt. 13, 2. Teil, H. 1. — P. MANTEUFEL: Serologische Verfahren der Nahrungsmitteluntersuchung, in E. ABDERHALDEN: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 4, 8. Teil, 2. Hälfte, S. 1808. — P. UHLENHUTH: Die serologischen Untersuchungsmethoden von Fleisch, Fleisch- und Wurstwaren, Eiern, Fischen und anderen tierischen Nahrungsmitteln, in GOTSCHLICH: Handbuch der hygienischen Untersuchungsmethoden, Bd. 2. 1927. — P. UHLENHUTH u. W. SEIFFERT: Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präcipitation mit besonderer Berücksichtigung der Technik, in KOLLE, KRAUS, UHLENHUTH: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl., Bd. 3, 1. Teil, S. 365. 1930. Der letztgenannte Abschnitt enthält die vollständigste Zusammenstellung der Literatur.

bisher nicht möglich ist. Die präcipitierenden Sera sind deshalb für die gerichtliche Chemie und Medizin wie auch für die Lebensmitteluntersuchung unentbehrlich. In der Regel dienen sie nur zum qualitativen Nachweis, bis zu einem gewissen Grade aber auch zur quantitativen Bestimmung der in Betracht kommenden Proteine. Bei ihrer Anwendung ist zu berücksichtigen, daß die Präcipitinreaktion nur innerhalb gewisser Grenzen für Art und Organ spezifisch und infolgedessen nur unter bestimmten Arbeitsbedingungen beweisend ist. Daher erfordert die Ausführung der Reaktionen erstens genaue Kenntnis der Wertigkeit des jeweils zur Verwendung gelangenden Antiserums und zweitens genaues quantitatives Arbeiten mit Hilfe fein graduerter Pipetten unter gleichzeitiger Berücksichtigung aller bei dem Verfahren in Betracht kommenden Fehlerquellen.

Die erste Anregung zur Verwendung präcipitierender Sera zur Unterscheidung von Blutarten haben fast gleichzeitig UHLENHUTH sowie WASSERMANN und SCHÜTZE gegeben. Insbesondere durch die grundlegenden Arbeiten von UHLENHUTH und seinen Mitarbeitern ist dann das Präcipitinverfahren nach der praktischen Seite hin ausgebaut worden. Besonders eingehend bearbeitet wurden hierbei die Methoden zur Unterscheidung von Blut- und Fleischarten. Über den Nachweis von Pferdefleisch mit Hilfe des UHLENHUTHschen Verfahrens ist sodann in der Folgezeit eine ganze Reihe von Arbeiten erschienen, darunter von FIEHE<sup>1</sup>, BAIER und REUCHLIN<sup>2</sup>, BEHRE<sup>3</sup>.

Den Nachweis von Eigelb in Eierweinbrand, Eierteigwaren und Eigelbmargarine konnte als erster UHLENHUTH mit Hilfe eines Dotterantiserums erbringen und neuere Versuche von VOLLHASE, STEINBECK und DANIELSEN<sup>4</sup> haben gezeigt, daß sich noch 0,25% Trockeneigelb in Margarine nachweisen lassen. THÖNI<sup>5</sup> hat für die Honiguntersuchung ein quantitatives Präcipitinverfahren ausgearbeitet (S. 696), das in das Schweizerische Lebensmittelbuch aufgenommen wurde. Der Nachweis von Wurstbindemitteln vom Charakter des Plasmons (S. 694) konnte durch GRIEBEL und MAASS<sup>6</sup> geführt werden. Den letztgenannten gelang es auch in Marzipan und Persipan fremde Samen (Haselnuß, Pinien- und Anakardiensamen), sowie in Schokoladen einen Zusatz von Mandeln und Haselnüssen mit Hilfe der Präcipitinreaktion nachzuweisen (S. 698). Zu nennen ist weiter die Erkennung von Kaviarverfälschungen oder -Nachmachungen (KODAMA) sowie die Unterscheidung der verschiedenen Milcharten durch JORDANOFF<sup>7</sup> (S. 693) mit Hilfe präcipitierender Sera, ohne daß mit dieser Aufzählung die Anwendbarkeit des Verfahrens auf dem Gebiet der Lebensmitteluntersuchung erschöpft wäre.

## A. Nachweis und Differenzierung von Blut- und Fleischarten.

### 1. Herstellung präcipitierender Antisera.

Die gebräuchlichen Antisera wird der Praktiker in der Regel aus geeigneten Anstalten<sup>8</sup> beziehen. In Sonderfällen kann er jedoch mitunter gezwungen sein, sich die erforderlichen Sera selbst herzustellen.

<sup>1</sup> FIEHE: Z. 1907, 13, 744. — <sup>2</sup> BAIER u. REUCHLIN: Z. 1908, 15, 513.

<sup>3</sup> BEHRE: Z. 1908, 15, 521. — <sup>4</sup> VOLLHASE, STEINBECK u. DANIELSEN: Z. 1929, 58, 342.

<sup>5</sup> THÖNI: Schweizer. Mitt. Lebensm.-Unters. 1911, 2, 80; 1912, 3, 74; Z. 1913, 25, 490.

<sup>6</sup> GRIEBEL u. MAASS: Z. 1932, 63, 166.

<sup>7</sup> JORDANOFF: Zeitschr. Fleisch- u. Milchhyg. 1932, 42, 300.

<sup>8</sup> Als Bezugsquellen für präcipitierende Antisera kommen hauptsächlich das Reichsgesundheitsamt (Berlin-Dahlem), das Hygienische Institut Greifswald, das Serotherapeutische Institut in Wien in Betracht, die die gebräuchlichsten spezifischen Antisera an amtliche Untersuchungsstellen gegen Entgelt abgeben. Außerdem bringen auch einige Serumfabriken, wie z. B. das Sächsische Serumwerk in Dresden, die gangbarsten Antisera in den Handel.

Eine kurze Darstellung der Methode der Serumgewinnung, die für alle Arten von Proteinen im Prinzip die gleiche ist, wird daher für jeden Lebensmittelchemiker, der sich mit serologischen Untersuchungen zu befassen hat, hier von Interesse sein. Bemerkte sei jedoch, daß die Technik im einzelnen in entsprechend eingerichteten Anstalten erlernt werden muß.

Das geeignetste Tier für die Erzeugung hochwertiger präcipitirender Sera ist das Kaninchen (langohrige Sorte), allenfalls kommt noch das Huhn in Betracht (z. B. für die Erzeugung von Präcipitinen gegen Kaninchenprotein), während sich insbesondere größere Tiere, wie Hunde, Schafe, Ziegen, Pferde, für diese Zwecke als wenig brauchbar erwiesen haben. Doch machen sich auch bei den Kaninchen in bezug auf die Eignung beträchtliche individuelle Unterschiede bemerkbar; manche Tiere liefern überhaupt kein brauchbares Serum. Deshalb empfiehlt es sich, stets mehrere Tiere zugleich in Behandlung zu nehmen, zumal da man auch immer mit gelegentlichen Tierverlusten durch besondere Zwischenfälle rechnen muß.

Die Behandlung (Immunisierung) der Tiere erfolgt mit einer möglichst konzentrierten Lösung desjenigen Proteins, das durch die Präcipitinreaktion nachgewiesen werden soll. Für die Gewinnung von Antiserum gegen bestimmte Fleisch- oder Blutarten wird jedoch an Stelle des früher vielfach verwendeten Fleischsaftes oder defibrinierten Blutes jetzt in der Praxis zumeist nur noch Blutserum gebraucht, da sich gezeigt hat, daß die Präcipitine hauptsächlich durch das im Serum enthaltene Protein erzeugt werden. Um ein zum Nachweis von Pferdefleischprotein geeignetes Antiserum zu gewinnen, dient also als Immunisierungsmittel in der Regel Pferdeblutserum usw.

Menschenblut für Immunisierungszwecke gewinnt man mit Hilfe von Schröpfköpfen, durch Aderlaß oder bei der Geburt aus der Placenta. Bei größeren Tieren entnimmt man das Blut zweckmäßig aus der Vena jugularis durch Punktion mit einem sterilen Troikart und fängt es unter aseptischen Vorsichtsmaßnahmen in sterilen Glaszylindern auf. Kleinere Tiere müssen gewöhnlich geschlachtet werden, doch gelingt es z. B. beim Kaninchen aus der Ohrvene, bei Geflügel (Hühner, Tauben, Gänse) aus einer Flügelarterie hinreichende Blutmengen zu gewinnen.

Wenn es nicht möglich ist das Blut steril aufzufangen, so muß man das daraus erhaltene Serum durch Filtration mit Hilfe von BERKEFELD-Filtern nachträglich keimfrei machen.

Zur Gewinnung des Serums läßt man das frisch entnommene Blut in hohen sterilen, bakterien dicht verschlossenen Glaszylindern zunächst einige Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Nachdem sich der Blutkuchen gebildet hat, trennt man diesen mit einem sterilen Glasstab von der Gefäßwand ab und läßt sodann noch über Nacht im Eisschrank stehen. Das Serum hat sich dann klar ausgepreßt und kann mittels steriler Pipetten in sterile Röhren abgefüllt werden. So gewonnenes Injektionsmaterial läßt sich längere Zeit im Eisschrank aufbewahren. Empfohlen wird auch ein Zusatz von wenig Chloroform oder 0,5% iger Phenollösung. Frisch entnommenes Blutserum wird vor der Verwendung zweckmäßig 30 Minuten auf 55° erwärmt, wodurch seine primäre Giftigkeit verringert wird.

Hat man kein frisches Blut zur Verfügung (z. B. von Wild während der Schonzeit), so kann man sich auch einer Lösung eingetrockneten Blutes in physiologischer Kochsalzlösung bedienen. Die erhaltene Flüssigkeit ist dann durch BERKEFELD-Filter oder SEITZ-Asbestfilter zu filtrieren.

Die Vorbehandlung der Tiere mit dem Injektionsmaterial kann intravenös oder intraperitoneal erfolgen. Bei nicht ganz sterilem Material ist die intravenöse Behandlung, die auch als die wirksamste anzusehen ist, weniger gefährlich. UHLENHUTH empfiehlt alle 5—6 Tage 1—3 ccm Serum zu injizieren, im ganzen 4—6mal. Die Injektion erfolgt beim Kaninchen in die Randvene des Ohres nach vorheriger Desinfektion der Injektionsstelle.

Da die Präcipitine bei den einzelnen Tieren nach verschiedener Zeit und in verschiedener Menge — bei manchen überhaupt nicht — auftreten, wird von der 3. Injektion an, und zwar etwa am 7. Tag nach der letzten Einspritzung stets eine Probekblutentnahme zur Feststellung des Präcipitingehaltes vorgenommen.

Zu dem Zweck erzeugt man in dem einen Kaninchenohr durch Klopfen oder durch Betupfen mit einem in heißes Wasser oder in Xylol getauchten Wattebausch eine Hyperämie, schneidet die hierdurch hervortretende Randvene unter aseptischen Vorsichtsmaßnahmen ein wenig ein und fängt das in Tropfen abfließende Blut (etwa 3 ccm) in einem sterilen Röhren auf. Das schon nach wenigen Stunden abgeschiedene Serum wird, wenn erforderlich, zentrifugiert, um es von Blutkörperchen zu befreien, dann abpipettiert und geprüft. Als brauchbar ist es anzusehen, wenn es nur in der homologen Blutlösung 1 : 1000, die man aus eingetrocknetem und dann zerriebenem Blut mit physiologischer Kochsalzlösung herstellt, sofort oder nach wenigen Minuten einen deutlichen Niederschlag erzeugt. Trifft dies zu, so empfiehlt es sich nach den Beobachtungen von UHLENHUTH, NUTTAL und anderen Autoren das betreffende Tier nicht weiter zu behandeln, sondern alsbald zu entbluten, da nicht selten ein plötzlicher Schwund an Präcipitinen eintritt. Vor der

Entblutung soll man die Tiere jedoch noch 24 Stunden hungern lassen, weil man durch diese Maßnahme klarere Sera erzielt.

Nach der von UHLENHUTH angegebenen Methode wird das gewonnene Blut in Zylinder gefüllt, die bei Zimmertemperatur etwa 24 Stunden stehen bleiben. Danach hat sich meist ein farbloses klares Serum abgesetzt, das mit einer sterilen Pipette in sterile Reagenzgläser übertragen wird.

## 2. Eigenschaften und Aufbewahrung der Antisera.

Ein brauchbares Antiserum soll nach UHLENHUTH steril und völlig klar (opalisierende Sera sind unbrauchbar), hochwertig und artspezifisch sein.

**a) Filtration und Abfüllung der Antisera.** Zur Erfüllung der ersten Forderung empfiehlt UHLENHUTH die Filtration der frisch gewonnenen Sera durch ein steriles BERKEFELD-Filter oder SEITZSches Asbestfilter. Er verwendet hierzu einen „Filtrierabfüllapparat“, der zugleich ein steriles Abfüllen des Antiserums in die zur Aufbewahrung bestimmten Röhrchen ermöglicht. Der Apparat, der sich im wesentlichen aus einer Kieselgurkerze (*a*) — neuerdings werden statt dessen auch SEITZSche Filter empfohlen —, einer Saugflasche (*b*) mit Abfüllvorrichtung (*h, g*) und einer Wasserstrahlpumpe (*c, d*) zusammensetzt, ist in Abb. 3 wiedergegeben. Hinsichtlich der Handhabung des Apparates sei auf die von UHLENHUTH und WEIDANZ<sup>1</sup> gegebene eingehende Beschreibung und Gebrauchsanweisung verwiesen. Es empfiehlt sich zur Filtration von Antiserum jedesmal eine neue Kerze zu verwenden, die zunächst durch gewöhnliche und umgekehrte Filtration (Abb. 4) mit steriler Kochsalzlösung gereinigt wurde. Auch nach jeder Filtration von Serum wird eine sorgfältige Reinigung der Kerze durch umgekehrte Filtration vorgenommen. Hierauf wird die Kerze in destilliertem Wasser ausgekocht und später sterilisiert.

Die Abfüllung des als brauchbar befundenen Antiserums [vgl. unter b)] erfolgt nach UHLENHUTH in Mengen von je 1 ccm in braune Röhrchen von etwa 12,5 cm Länge und 7 mm Durchmesser, die zuvor sorgfältig mit Wasser gereinigt und nach dem Trocknen, mit Wattebausch versehen, bei 150° sterilisiert werden müssen. Sehr zweckmäßig sind die von MANTEUFEL empfohlenen Röhrchen mit ausgezogener Spitze (Abb. 5). Bei etwaigen Trübungen des Serums kann man diese durch Zentrifugieren in die Spitze des Röhrchens hineinschleudern, so daß sich das klare Serum mit Hilfe der Pipette bis zum letzten Tropfen entnehmen läßt. NUTTAL, FIEBE u. a. verwenden beiderseits zu Capillaren ausgezogene Röhrchen für die Aufbewahrung der Sera.

Die zur Konservierung der präcipitierenden Antisera vielfach vorgeschlagenen Zusätze (Chloroform, Phenol, Chinosol usw.) haben sich nicht bewährt, auch nicht das von CORLN und STOCKIS empfohlene Eintrocknen im Vakuum. Dagegen halten sich die steril abgefüllten, in braunen zugeschmolzenen Röhrchen im Eisschrank aufbewahrten Antisera jahrelang. Der bei längerer Aufbewahrung

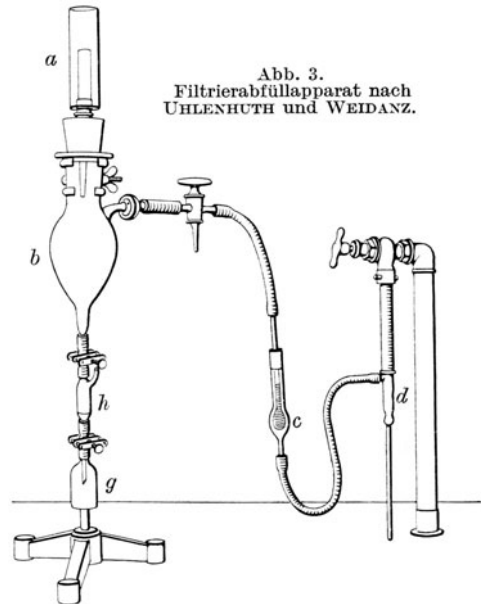


Abb. 3.  
Filtrierabfüllapparat nach  
UHLENHUTH und WEIDANZ.

<sup>1</sup> UHLENHUTH u. WEIDANZ, S. 212.

zumeist auftretende geringe weißliche Bodensatz, ist möglicherweise auf Auto-  
präcipitation zurückzuführen, d. h. auf das Vorhandensein von Spuren Präci-  
pitinogen in dem präcipitinhaltigen Serum.

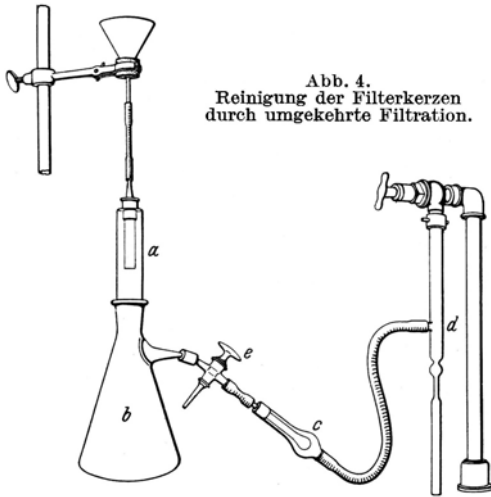


Abb. 4.  
Reinigung der Filterkerzen  
durch umgekehrte Filtration.

Zeigt ein Serum jedoch opali-  
sierende Trübung — eine solche  
läßt sich auch durch Filtration  
nicht beseitigen —, so ist es für  
unsere Zwecke ungeeignet, weil die  
Opalescenz leicht zu Irrtümern in  
der Beurteilung der Reaktion führen  
kann. Deshalb wird empfohlen ein  
Tier erst dann zu töten, wenn die  
Opalescenz des Serums verschwun-  
den ist. Gewöhnlich erreicht man  
dies durch eintägiges Hungernlassen  
der Tiere vor der Blutentnahme.

b) **Titerstellung.** Die Wertigkeit  
des Antiserums, die für die prak-  
tische Verwendbarkeit von großer  
Bedeutung ist, wird durch Bestim-  
mung des Titers geprüft, was in verschiedener Weise erfolgen kann. Die Titer-  
bestimmung gestaltet sich am einfachsten nach UHLENHUTH und BEUMER durch  
Feststellung der stärksten Proteinverdünnung, in der das betreffende Antiserum  
noch eine Trübung erzeugt.



Abb. 5.  
Serumlöhrchen  
nach  
MANTEUFFEL.

Zu dem Zweck stellt man zunächst von dem Serum, zu  
dessen Nachweis das Antiserum dienen soll, Verdünnungen mit  
0,85%iger Kochsalzlösung her, und zwar 1:1000, 1:10000,  
1:20000. Für die Bestimmung werden sodann vier gleichmäßig  
dicke und absolut saubere Reagensröhrchen ausgewählt und in  
das UHLENHUTH-BEUMERSche Reagensglasgestell (Abb. 6) gehängt.  
Mit einer sterilen Pipette gibt man hierauf in die Röhrchen I,  
II und III je 1 ccm der klaren Verdünnungen 1:1000, 1:10000  
und 1:20000. In das Röhrchen IV kommt 1 ccm steriler 0,85%iger  
Kochsalzlösung. Zum Einfüllen genügt eine einzige, 1 ccm fassende  
Pipette, wenn man zuerst Röhrchen IV, dann III, II und schließ-  
lich I beschickt.

Jedes Röhrchen erhält sodann einen Zusatz von 0,1 ccm des  
zu prüfenden Antiserums, das aus einer sterilen graduierten  
Pipette (1 ccm mit 100 Teilstrichen) zugegeben wird. Ohne zu  
schütteln, werden die Röhrchen hierauf bei durchfallendem  
Lichte betrachtet, indem man zwischen Lichtquelle und Reagens-  
röhrchen einen schwarzen Karton in schräger Lage auf- und  
abbewegt.

Nach UHLENHUTH ist von einem brauchbaren Antiserum zu  
verlangen, daß es im Röhrchen I fast augenblicklich, spätestens  
nach 1—2 Minuten, im Röhrchen II bzw. III in etwa 3 bzw.  
5 Minuten eine deutliche Trübung hervorruft. Röhrchen IV muß vollkommen  
klar bleiben. Der Titer ist in diesem Fall 1:20000.

c) **Spezifitätsprüfung.** Im Anschluß an die Titerfeststellung erfolgt die  
Prüfung des Antiserums auf seine Spezifität; denn ein hochwertiges Serum ist  
nur dann brauchbar, wenn es zugleich artspezifisch ist, was durchaus nicht  
immer zutrifft.

Man verfährt hierbei nach UHLENHUTH in der Weise, daß man sich einerseits eine Verdünnung des homologen Serums 1:1000, andererseits Verdünnungen verschiedener heterologer Proteinlösungen von je 1:200 und 1:1000 herstellt. Man wählt hierbei immer die bei der praktischen Anwendung des Antiserums hauptsächlich in Betracht kommenden Proteine und prüft also z. B. ein Pferdeantiserum, das bei der Wurstuntersuchung Verwendung finden soll, hauptsächlich gegen Schweine- und Rinderserum bzw. gegen entsprechende Fleischauszüge.

Zu je 1 ccm dieser Flüssigkeiten wird je 0,1 ccm des zu prüfenden Antiserums zugesetzt. Ein gutes Antiserum soll in der homologen Proteinlösung sofort eine deutliche Trübung hervorrufen, während die heterologen Proteinlösungen auch nach etwa 20 Minuten noch klar bleiben müssen. Antisera, die starke heterologe Trübungen geben (übergreifende Antisera), sind für die Praxis unbrauchbar.

### 3. Ausführung der Präcipitinreaktion (biologischen Reaktion).

Eine ganz besondere Bedeutung hat die Präcipitinreaktion für die Differenzierung von Blutarten, namentlich in der Kriminalistik für den Nachweis von Menschenblut und für die Unterscheidung von Fleischarten (Wurstuntersuchung) erlangt. Die für diese Zwecke von UHLENHUTH und seinen Mitarbeitern ausgearbeiteten Verfahren können zugleich als allgemeine Richtschnur für jede Proteindifferenzierung gelten. Sie sollen deshalb hier ausführlicher wieder gegeben werden.

Vorauszuschicken ist, daß alle bei der Ausführung der Präcipitinreaktion zur Verwendung gelangenden Apparate steril, sämtliche Flüssigkeiten klar sein müssen. Als Lösungs- und Verdünnungsmittel kommt praktisch nur 0,85%ige Kochsalzlösung in Betracht, soweit es sich um den Nachweis und die Unterscheidung von Blut- und Fleischarten handelt.

#### a) Gang einer Blutuntersuchung.

Mit Hilfe der Präcipitinreaktion läßt sich nicht Blut als solches, sondern nur ein bestimmtes Protein erkennen. Wenn daher irgendein Material auf die Herkunft blutverdächtiger Flecke zu prüfen ist, so muß zunächst durch die übliche chemische, mikroskopische und spektroskopische bzw. mikrospektroskopische Untersuchung<sup>1</sup> festgestellt werden, ob überhaupt Blut vorliegt. Bei sehr geringen Materialmengen wird man sich auf die mikrospektroskopische Prüfung beschränken und bei positivem Ausfall das übrige Material zur biologischen Prüfung verwenden. Bevor man jedoch an ihre Ausführung geht, muß man sich durch Kontrollversuche zunächst überzeugen, ob man das in Betracht kommende spezifisch wirkende Antiserum in guter Beschaffenheit zur Hand hat — sofern man dessen nicht ganz sicher ist —, da sonst unter Umständen unersetzliches Beweismaterial zerstört werden könnte. Deshalb ist es zweckmäßig, die in der forensischen Praxis häufiger vorkommenden Blutarten immer als Vergleichsmaterial bereit zu halten. Solches Vergleichsmaterial stellt man sich am besten nach der von UHLENHUTH vorgeschlagenen Eintrocknungsmethode her. Zu dem Zweck wird möglichst steril entnommenes Blut oder Serum in PETRI-Schalen oder auf Glasplatten in dünner Schicht rasch angetrocknet (Sonne, Brutschrank oder Föhn-Apparat) und das abgekratzte Material dann in Reagensgläschen aufbewahrt. Es ist in dieser Form fast unbegrenzt haltbar.

Im Bedarfsfall extrahiert man eine kleine Probe des zerriebenen Testmaterials in einem Reagensgläschen mit 0,85%iger Kochsalzlösung, ohne zu schütteln,

<sup>1</sup> Vgl. z. B. O. LEERS: Die forensische Blutuntersuchung. Berlin 1910.

bis eine genügende Menge Eiweiß in Lösung gegangen ist, was man an der gelblichen Farbe erkennt, sowie daran, daß die abgegossene Flüssigkeit beim Schütteln Schaum bildet, der einige Zeit stehen bleibt.

Für die biologische Blutuntersuchung schreibt UHLENHUTH eine Proteinverdünnung von annähernd 1 : 1000 vor. Eine solche Verdünnung ist erreicht, wenn etwa 1 ccm der Flüssigkeit nach Zusatz eines Tropfens 25%iger Salpetersäure beim Aufkochen eine leicht opalisierende Trübung gibt. Ist die Lösung konzentrierter, was zumeist der Fall ist, so wird sie solange mit 0,85%iger Kochsalzlösung verdünnt, bis die Salpetersäure-Kochprobe den richtigen Grad der Verdünnung anzeigt.

Für die Ausführung der Reaktion ist das von UHLENHUTH und BEUMER angegebene Reagensglasgestell (Abb. 6) zu empfehlen, das für 12 kleine Reagensröhrchen von je 11 cm Länge und 0,9 cm Durchmesser Platz hat. An ihrer Öffnung haben die Röhrchen nach außen umgebogene Ränder, so daß man sie in den Löchern des Gestells aufhängen kann. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß sich die am Boden des Röhrchens auftretende Reaktion gut beobachten läßt. Der Übersichtlichkeit wegen sind die Löcher des Reagensglasgestelles mit den Nummern I bis XII versehen.

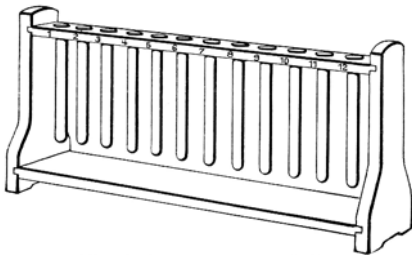


Abb. 6. Reagensglasgestell nach UHLENHUTH-BEUMER.

Nach Herstellung der erforderlichen Verdünnung der Vergleichsblutlösung — falls notwendig muß Filtration erfolgen —

bringt man in Röhrchen I und II je 1 ccm der verdünnten Blutlösung, während Röhrchen III die gleiche Menge steriler 0,85%iger Kochsalzlösung erhält. Mit einer graduierten Pipette (1 ccm in 100 Teile geteilt) werden hierauf den Röhrchen I und III je 0,1 ccm des zu prüfenden klaren Antiserums hinzugefügt, während Röhrchen II einen Zusatz von 0,1 ccm klaren normalen Kaninchen-serums erhält. Ohne zu schütteln, wird die Reaktion im durchfallenden Licht beobachtet, wobei man einen schräg unter die Röhrchen gehaltenen schwarzen Karton zu Hilfe nimmt. Ist das Antiserum brauchbar, so muß in Röhrchen I sofort oder spätestens nach 2—5 Minuten eine hauchartige, allmählich dichter werdende Trübung entstehen, während die Lösungen in Röhrchen II und III völlig klar bleiben.

Nachdem das Antiserum in dieser Weise auf seine Brauchbarkeit geprüft ist, wird das zu untersuchende verdächtige Material in geeigneter Weise vorbereitet. Auf fester Unterlage eingetrocknete Blutflecke werden mit einer sterilen Lanzette abgekratzt oder abgehoben. Gewebeteilchen werden ausgeschnitten und nach entsprechend feiner Zerkleinerung ebenso wie abgehobenes Material in einem kleinen Reagensgläschen mit 0,85%iger Kochsalzlösung extrahiert. Die Auslaugung, die ohne Schütteln erfolgen muß, ist gewöhnlich nach einer Stunde beendet, sie muß aber bei altem Material unter Umständen bis zu 24 Stunden ausgedehnt werden (Eisschrank, um Bakterienwachstum zu vermeiden). Einen Anhaltspunkt über die in Lösung gegangene Proteinmenge kann in der abgegossenen Lösung die Schaumprobe geben. Hierauf wird die Reaktion gegen Lackmuspapier geprüft, die weder stark alkalisch noch stark sauer sein darf. Als Neutralisationsmittel für stark saure Lösungen kommt 0,1%ige Natriumcarbonatlösung oder Magnesiumoxyd in Betracht.

Die ausgelaugte Flüssigkeit muß, sofern sie nicht ganz klar ist, durch kleine, gewöhnliche oder gehärtete Papierfilter geklärt werden, erforderlichenfalls durch Kieselgurfilter. Bei geringen Flüssigkeitsmengen ist hierfür der von UHLENHUTH

und WEIDANZ empfohlene Mikrofiltrierabfüllapparat mit SILBERSCHMIDT-scher Kieselgurkerze (Abb. 7) sehr geeignet, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß dichte Kieselgurfilter etwas Protein zurückhalten, so daß die Flüssigkeit hierbei auch proteinärmer wird.

Nach der Klärung erfolgt die etwa erforderliche Verdünnung der Proteinlösung auf 1 : 1000, wie oben beschrieben wurde, mit Hilfe der Salpetersäurekochprobe.

Die biologische Reaktion wird sodann in folgender Weise ausgeführt:

In das Reagensglasgestell werden 7 tadellos blanke Röhrchen gehängt. In die Röhrchen *I* und *II* kommt je 1 ccm der zu untersuchenden Blutlösung, in das Röhrchen *III* 1 ccm der dem Antiserum entsprechenden Vergleichsblutlösung 1 : 1000, in die Röhrchen *IV* und *V* je 1 ccm von Kontrollblutlösungen (bei der Prüfung auf Menschenblut, z. B. Schweine- und Rinderblut). Röhrchen *VI* erhält 1 ccm einer sterilen 0,85 % igen Kochsalzlösung und Röhrchen *VII* nötigenfalls einen Auszug des Stoffes, auf dem sich der Blutfleck befand.

Nunmehr erhalten die Röhrchen *I*, *III*, *IV*, *V*, *VI* und *VII* einen Zusatz von je 0,1 ccm des im Vorversuch geprüften Antiserums, Röhrchen *II* 0,1 ccm normales Kaninchenserum. Am besten läßt man das zugesetzte Serum vorsichtig an der Wand der Gläschen herunterfließen, so daß eine Unterschichtung der Lösungen eintritt, da das Antiserum in der Regel spezifisch schwerer ist. Ein Schütteln der Röhrchen darf nicht erfolgen. Zu einer Reaktion soll stets nur der Inhalt eines Röhrchens Verwendung finden, da eine Mischung von Antiseren, die von verschiedenen Kaninchen stammen, unter Umständen ein Präcipitat gibt.

Etwas getrübe Antisera lassen sich meist durch genügend langes Zentrifugieren klären, außer wenn es sich um Bakterientrübungen handelt. In diesem Fall ist das Serum nicht mehr verwendbar.

Um die Untersuchung kleinster Blutmengen zu ermöglichen, hat G. HAUSER die sog. Capillarmethode ausgearbeitet, die von CARNWATH modifiziert wurde. Hinsichtlich der Technik des Verfahrens sei hier auf UHLENHUTH-WEIDANZ<sup>1</sup> verwiesen.

**Beurteilung der Reaktion.** Verläuft die Reaktion positiv, so muß in Röhrchen *I* nach einigen Minuten, in Röhrchen *III* innerhalb einer Minute eine hauchartige Trübung entstehen, die sich zu einem allmählich deutlicher werdenden Ring an der Berührungsstelle von Antiserum und Proteinlösung verdichtet, während der Inhalt aller übrigen Röhrchen, die als Kontrollen dienen, in der 20 Minuten dauernden Beobachtungszeit klar bleiben muß. Die Beobachtung der Trübungen erfolgt bei durchfallendem Licht, indem zwischen Lichtquelle und Röhrchen ein schwarzer Schirm in schräger Lage auf- und abbewegt wird.

Nicht selten zeigen einige Röhrchen an der Kuppe eine vom Abschmelzen herrührende ringförmige Trübung. Ist man gezwungen, solche Röhrchen mit zu verwenden, so läßt sich eine positive Reaktion gleichwohl erkennen, indem man die Röhrchen vorsichtig neigt, wobei ein durch die Präcipitinreaktion entstandener Ring seine Lage verändert, während die Glastrübung natürlich hierbei unverändert bleibt.

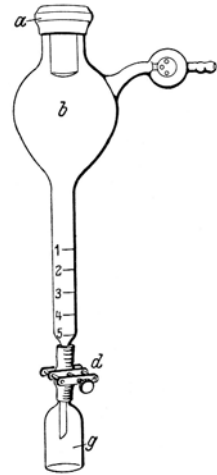


Abb. 7. Mikrofiltrierabfüllapparat nach UHLENHUTH und WEIDANZ.

<sup>1</sup> UHLENHUTH-WEIDANZ S. 51—55.



Heterologe Trübungen entstehen bei vorschriftsmäßiger Beschaffenheit des Serums und Einhaltung der vorgeschriebenen Verdünnungen nicht, sondern nur, wenn konzentrierte Blutlösungen mit erheblichen Mengen Antiserum versetzt werden. Sie sind aber auch dann weniger scharf als die homologen Trübungen und können mit diesen nicht leicht verwechselt werden.

Während der positive Ausfall der Reaktion mit Sicherheit das Vorhandensein der betreffenden Blutart beweist, ist der negative Ausfall noch kein Beweis für ihre Abwesenheit, weil durch äußere Verhältnisse die präcipitable Substanz zerstört worden sein kann (Erhitzung, Einwirkung von Chemikalien).

Bei der Beurteilung des Ergebnisses einer biologischen Blutuntersuchung ist jedoch stets darauf Rücksicht zu nehmen, daß das Protein nahe verwandter Tierarten (z. B. Mensch und Affe, Hase und Kaninchen, Pferd und Esel, Schwein und Wildschwein, Hund und Fuchs, Hammel, Ziege und Rind, Huhn und Taube) mit Hilfe der in der üblichen Weise hergestellten Antisera nicht sicher unterscheidbar ist.

Allerdings kann man durch die „elektive Absättigungsmethode“ nach WEICHARDT, die in der Ausfällung der heterologen Haptine mittels heterologen Serums besteht, und noch besser durch die von UHLENHUTH angegebene „kreuzweise Immunisierung“, d. h. durch Behandlung der einen Tierart mit dem Blutserum der anderen verwandten Tierart spezifische Sera erhalten, die auch die Unterscheidung nahe verwandter Tierarten gestatten, aber diese Verfahren spielen wegen ihrer Kompliziertheit für die Praxis kaum eine Rolle.

#### b) Gang einer Fleisch- oder Wurstuntersuchung; Prüfung auf Pferdefleisch.

Die Präcipitinreaktion ist weiter das geeignetste Mittel, wenn es sich darum handelt, die Herkunft einer Fleischprobe oder die Beimengung fremdartiger Fleisch- bzw. Proteinarten in einem Fleischgemenge, wie Hackfleisch oder Wurst, zu ermitteln. Und zwar ist die Reaktion nicht nur bei frischem Fleisch anwendbar, sondern auch bei gefrorenem, getrocknetem, gepökelt, geräuchertem, ja sogar bei faulendem und bis zu einem gewissen Grade selbst noch bei gekochtem Fleisch. Abgesehen von Muskelfleisch können Därme, Knochen und unter Umständen auch Fettgewebe in dieser Weise geprüft werden. Zumeist wird es sich in der Praxis um den Nachweis von Pferdefleisch handeln.

Die Herstellung der für die Untersuchung erforderlichen Lösungen ist bei der Prüfung von Fleischstücken oder von Wurst grundsätzlich die gleiche. Mit einem ausgeglühten Messer werden aus der Tiefe eines möglichst mageren Fleischstückes unter Aussonderung etwaiger Fetteilchen von einer frisch hergestellten Schnittfläche 30 g Fleisch abgeschabt. Bei sehr zähem Fleisch ist ein Wiege- oder Hackmesser zu verwenden. Die Fleischmasse wird in einem sterilen 100 ccm ERLÉNMEYER-Kolben mit 50 ccm steriler 0,85%iger Kochsalzlösung (BAIER und REÜCHLIN empfehlen 10 g Fleisch auf 400 ccm Kochsalzlösung zu nehmen) 3 Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Bei frischem Fleisch genügt meist 1 Stunde für das Ausziehen, bei gepökelt oder geräuchertem dauert es entsprechend länger, unter Umständen bis zu 24 Stunden. Ähnlich verhält sich manchmal faulendes Fleisch. Stark gesalzenes Fleisch kann in einem sterilisierten ERLÉNMEYER-Kolben zunächst 10 Minuten lang durch mehrmaliges Behandeln mit Wasser, ohne zu schütteln, entsalzen werden. Schütteln ist beim Ausziehen stets zu vermeiden, um die Lösung nicht durch Fetttröpfchen zu trüben. Zur Beschleunigung der Lösung wird besonders bei fettem Fleisch der Zusatz einiger Tropfen Chloroform empfohlen.

Der Fleischauszug soll ungefähr 1 Teil Protein in 300 Teilen enthalten. Um zunächst festzustellen, ob eine ausreichende Konzentration erreicht ist, wird die Salpetersäurekochprobe ausgeführt. Wenn man etwa 1 ccm des Auszuges unter Zusatz eines Tropfens 25%iger Salpetersäure aufkocht, so muß eine Fällung auftreten, die sich sogleich als flockiger Niederschlag zu Boden senkt. Die Stärke des beim Schütteln auftretenden Schaums läßt hier deswegen keinen Schluß auf die Konzentration der Proteinlösung zu, weil die Schaumbildung vom Fettgehalt abhängig ist. Gewöhnlich sind die erhaltenen Fleischauszüge zu konzentriert; sie müssen daher nach der Filtration verdünnt werden (vgl. weiter unten).

Nach dem positiven Ausfall der Vorprüfung muß ein absolut klares Filtrat der Fleischlösung hergestellt werden. Dies gelingt bei magerem und frischem Fleisch schon mittels 1—2maliger Filtration durch mit steriler Kochsalzlösung befeuchtete gehärtete Filter von Schleicher & Schüll; Auszüge aus fetterem und stärker gepökeltm Fleisch filtriert man nach dem Anschütteln mit geglühter Kieselgur durch ein doppeltes gehärtetes Filter oder durch geglühte Kieselgur, die mit steriler, 0,85%iger Kochsalzlösung zu einem dünnen Brei verrührt, in etwa 2 mm dicker Schicht auf die mit einem Papierfilter bedeckte Filterplatte eines BÜCHNERSCHEN Trichters aufgetragen wird. Natürlich sind auch BERKEFELD-Filterkerzen brauchbar, jedoch müssen sie stets sterilisiert sein, weil bei der Empfindlichkeit der Methode selbst durch geringfügige Mengen eines früher in das Filter gelangten Proteins unter Umständen eine positive Reaktion vorgetäuscht werden könnte.

Schwieriger ist die Herstellung einer brauchbaren Lösung aus bearbeitetem Fleisch, insbesondere aus Wurst. Bei Untersuchungen von Wurst auf Pferdefleisch wird zweckmäßig das Material aus der Mitte der dicksten Stelle der Wurst entnommen, da hier Räucherung und etwaiges Kochen am wenigsten geschadet haben. Die Wurst (etwa 30 g) wird unter Aussonderung größerer Fetteilchen möglichst fein zerkleinert, nötigenfalls im Mörser zerrieben und dann mit 50 ccm 0,85%iger Kochsalzlösung ausgelaugt (BAIER und REUCHLIN wenden 10 g auf 200 ccm Kochsalzlösung an). Bei magerer Wurst, die durch Räuchern wenig gelitten hat, genügt hierzu manchmal schon 1 Stunde, bei leicht gekochten Würsten muß die Auslaugung zuweilen 2 Tage fortgesetzt werden. UHLENHUTH empfiehlt in solchen Fällen das ausgelaugte Fleisch nach dem Abgießen der Flüssigkeit durch ein Koliertuch abzupressen und den Preßsaft mit dem Extrakt zu mischen. In besonders schwierigen Fällen kann man die Wurstteile mit Glasstaub im Porzellanmörser verreiben und mit dem gleichen Volumen Kochsalzlösung 1 Stunde in einem Schüttelapparat nach UHLENHUTH schütteln. Fette Würste soll man nach MIESSNER und HERBST vor der Auslaugung 24 Stunden mit Äther oder Chloroform ausziehen.

Die Filtration der Wurstauszüge muß in der Regel unter Verwendung von Kieselgur in der bereits geschilderten Weise erfolgen.

Der klare Fleisch- oder Wurstauszug wird alsdann mit 0,85%iger Kochsalzlösung auf die geforderte Konzentration 1 : 300 verdünnt. Diese ist erreicht, wenn bei Zusatz von einem Tropfen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,153 zu 1 ccm des zum Kochen erhitzten Filtrates eine gleichmäßige opalisierende Trübung auftritt, die sich nach 5 Minuten langem Stehen als eben erkennbarer Niederschlag zu Boden senkt.

Ist die Lösung stark sauer, so ist sie mit 0,1%iger Natriumcarbonatlösung vorsichtig bis zu schwach alkalischer Reaktion zu versetzen; doch ist jeder Überschuß an Alkali sorgfältig zu vermeiden. Sicherer ist noch Magnesiumoxyd (nach SCHMIDT, BAIER und REUCHLIN).

Bei der biologischen Fleisch- und Wurstuntersuchung handelt es sich in der Praxis fast immer um den Nachweis von Pferdefleisch. Man braucht daher in einem solchen Fall ein hochwertiges Pferdefleischantiserum und zur Kontrolle Auszüge von Pferde-, Rind- und Schweinefleisch, normales Kaninchen-serum und außerdem 0,85%ige Kochsalzlösung.

Da es lästig ist, für die Kontrollauszüge in jedem Fall frisches Fleisch zu beschaffen, stellt man sich zweckmäßig von jeder Sorte eine für einige Zeit ausreichende Menge Trockenfleisch her, indem man magere Fleischstücke durch Schaben zerkleinert und das Geschabte dann in möglichst dünner Schicht auf Glasplatten ausbreitet. Das Trockenfleisch muß bei verhältnismäßig niedriger Temperatur (etwa 40°) erfolgen und kann durch Zuhilfenahme eines Föhnapparates sehr beschleunigt werden. Das getrocknete Material wird abgekratzt und in Gläsern aufbewahrt.

Für die biologische Fleisch- bzw. Wurstuntersuchung sind 6 Röhrchen erforderlich, die in dem UHLENHUTH-BEUMERSchen Gestell (Abb. 6) aufgehängt werden.

Die Ausführung der Reaktion, bei der natürlich sterile Gläser und Pipetten verwendet werden, wird nun folgendermaßen angestellt: Es werden pipettiert in Röhrchen:

*I* und *II*: 1 ccm der zu untersuchenden Lösung.

*III*: 1 ccm eines klaren Pferdefleischauszuges gleicher Konzentration.

*IV*: 1 ccm eines klaren Rindfleischauszuges gleicher Konzentration.

*V*: 1 ccm eines klaren Schweinefleischauszuges gleicher Konzentration.

*VI*: 1 ccm sterile 0,85%ige Kochsalzlösung.

Bei der Wurst-Untersuchung empfiehlt es sich, die Röhrchen *III*, *IV* und *V* in gleicher Weise mit einem entsprechenden Auszug aus Pferdewurst (mit etwa 30% Pferdefleisch), reiner Rinderwurst und reiner Schweinewurst zu beschicken.

Zu sämtlichen Röhrchen mit Ausnahme von *II* wird dann 0,1 ccm klares hochwertiges Pferdeantiserum in der Weise hinzugesetzt, daß es an der Wand herabfließt und sich am Boden sammelt. Röhrchen *II* erhält dagegen 0,1 ccm klares normales Kaninchen-serum. BAUER und REUCHLIN bringen zuerst 6 Tropfen Antiserum in die Röhrchen und überschichten diese dann vorsichtig mit 1 ccm der Lösung. Die Röhrchen bleiben bei Zimmertemperatur stehen. Auch im übrigen gelten hierbei dieselben Vorsichtsmaßregeln wie bei der Blutuntersuchung. Insbesondere ist jedes Schütteln zu vermeiden.

Zu berücksichtigen ist, daß man für die Wurstuntersuchung ein sehr hochwertiges Pferdefleischantiserum benötigt, da die Würste unter Umständen nur geringe Mengen Pferdefleisch enthalten. Jedoch reicht ein Antiserum mit dem Titer 1 : 20000 praktisch für alle Fälle aus, da UHLENHUTH mit einem solchen noch einen Pferdefleischzusatz von 5% nachweisen konnte.

Die unterschiedliche Forderung in der Proteinkonzentration bei Blutlösungen (1 : 1000) und Fleischlösungen (1 : 300) erklärt sich dadurch, daß der Gehalt an koagulierbarem Protein in der 1000fachen Verdünnung eines Blutserums ungefähr dem eines wässrigen Fleischauszuges in 300facher Verdünnung entspricht. Die Fleischauszüge sind also weniger reich an koagulierbarem Protein als die Blutsera, zumal wenn es sich um gepökelttes, geräuchertes oder gar gekochtes Fleisch handelt. Der Titer eines mit Blutserum als Antigen erzeugten und gegen Blutserum austitrierten Antiserums (z. B. 1 : 20000) ist daher für einen homologen Fleischauszug merklich geringer.

**Beurteilung der Reaktion.** Die Röhrchen werden sofort beobachtet, indem man zwischen Lichtquelle und Röhrchen einen schräg gehaltenen schwarzen

Karton auf- und abbewegt. Bei Fleisch ist die Reaktion positiv, wenn sogleich oder spätestens nach etwa 2 Minuten im Röhrchen *I* und *III* eine hauchartige Trübung auftritt. Sie beginnt an der Berührungsstelle des Serums und der Fleischlösung und verbreitet sich allmählich, bis die Flüssigkeit gleichmäßig getrübt ist. Die Trübung verdichtet sich allmählich zu einem Niederschlage. Die Reaktion muß spätestens nach 30 Minuten abgeschlossen sein. Später auftretende Trübungen dürfen als positive Reaktionen nicht aufgefaßt werden. Die früheren Bemerkungen über heterologe Trübungen, Verwandtschaftsreaktionen, elektive Absättigung gelten auch hier. Insbesondere vergesse man nicht, daß die positive Reaktion bei der Prüfung auf Pferdefleisch nur für Einhufer spricht, eine weitere Spezialisierung aber nicht zuläßt, weil das Fleisch von Esel, Maulesel usw. ebenso reagiert. Für die rechtliche Beurteilung ist dies allerdings unerheblich.

Bei Wurst lassen sich, da kein Anhalt für den Gehalt der Lösungen an Pferdeprotein vorhanden ist, über Einsetzen, Stärke und Dauer der Reaktion keine bestimmten Angaben machen. Es können noch nach 10 Minuten spezifische Trübungen auftreten. Doch lassen sich auch hier bei genügender Übung absolut sichere Ergebnisse erzielen.

**Nachweis von gekochtem Fleisch.** Die Anwendbarkeit der Präcipitinreaktion erleidet dadurch eine gewisse Einschränkung, daß das Verfahren dann versagt, wenn die für den Nachweis in Betracht kommenden Proteine durch Kochen vollständig unlöslich geworden sind. In diesem Fall ist auch eine längere Auslaugung und das oben angegebene Verreiben des zu untersuchenden Objektes mit Glasstaub und darauffolgendes Behandeln in der Schüttelmaschine, das noch zu positiven Ergebnissen führt, wenn im Innern des Objektes die Temperatur 70° nicht überschritten hatte, erfolglos.

Nach W. A. SCHMIDT<sup>1</sup> ist es allerdings möglich, mit alkalischen, durch Verwendung stark verdünnter Natronlauge gewonnenen Auszügen aus Protein (Serum), das 30 Minuten auf 70° erhitzt war, Präcipitine zu gewinnen, die mit einer ebensolchen alkalischen Lösung von durch Hitze koagulierte homologem Protein reagieren. Dieses „Hitze-Alkali-Präcipitin“ ist bis jetzt das einzige Mittel zur Differenzierung von unlöslichem Protein.

R. ROSENBERG<sup>2</sup>, die die Feststellungen SCHMIDTS bestätigen konnte, fand außerdem, daß solche Antisera auch natives Protein ausgezeichnet präcipitieren. Auf Grund der Ergebnisse von SCHMIDT, FUDJIWARA<sup>3</sup> und ROSENBERG hat dann MANTEUFEL<sup>4</sup> weitere Versuche über die Immunisierung mit Proteinantigenen (Serum), das durch Kochen koaguliert war, angestellt, indem er ebenfalls eine alkalische Lösung anwandte. Die erhaltenen Antisera wirkten sowohl auf natives als auch auf gekochtes Protein, lieferten geringere heterologe Trübungen und eingeschränkte Verwandtschaftsreaktionen. Da diese Antisera aber gegen Antigen aus durch Kochen koagulierte Fleischprotein nicht reagierten, wurden zur Gewinnung brauchbarer Sera die Tiere mit einer alkalischen Lösung von koagulierte Fleischantigen behandelt, jedoch mit negativem Ergebnis.

Abgesehen davon, daß die Herstellung von Hitze-Alkali-Präcipitin nach SCHMIDT und ähnlicher Antisera mit großen Schwierigkeiten verbunden ist, ist es bisher auch nicht gelungen, wirklich brauchbare Antisera gegen gekochtes

<sup>1</sup> W. A. SCHMIDT: Zeitschr. Imm. Forsch. 1912, 13, H. 2.

<sup>2</sup> R. ROSENBERG: Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig. 1926, 98, 259.

<sup>3</sup> FUDJIWARA: Zeitschr. gerichtl. Med. 1922, 1, 562.

<sup>4</sup> MANTEUFEL: Arb. Reichsgesundh.-Amt 1926, 57, 41.

Fleischprotein herzustellen. Außer dem UHLENHUTHSchen Verfahren (länger dauernder Extraktion usw.) ist daher bis jetzt kein weiteres für die Praxis brauchbar.

**Nachweis von Wurstbindemitteln.** Bei der Wurstuntersuchung kommt außer dem Pferdefleischnachweis auch die Erkennung bestimmter Wurstbindemittel auf serologischem Wege in Betracht (vgl. S. 694).

#### e) Untersuchung von Fettgewebe, Fetten, Knochen und Därmen.

Auch aus Fettgewebe (Knochenmark), sogar aus Fett (Schmalz), das nur unter geringer Erwärmung ausgelassen wurde, läßt sich nach den Untersuchungen von UHLENHUTH, BEUMER, WEIDANZ, HÜNE<sup>1</sup>, FIEHE<sup>2</sup> u. a. gewöhnlich eine hinreichende Menge reaktionsfähigen Proteins für die Ausführung der biologischen Reaktion gewinnen. UHLENHUTH und HÜNE empfehlen dafür Zerschaben des Fettgewebes und Entfernen des Fettes durch wiederholten Zusatz von Benzin (37°) und vorsichtiges Abgießen der Flüssigkeit vom Bodensatz, wiederholtes Verreiben des Rückstandes in einer auf etwa 40° erwärmten Reibschale und Ausziehen mit Benzin, bis das abgegossene Benzin auf Papier keinen Fleck mehr hinterläßt und der Rückstand eine reine Fleischfarbe annimmt und Trocknen des Rückstandes im Brutschrank bei 37°, bis die Masse faserig bröckelig ist. Die weitere Behandlung erfolgt in der üblichen Weise, wobei sich als Extraktionsmittel Wasser besser bewährt hat als physiologische Kochsalzlösung. Vom Fettgewebe genügen beim Schwein etwa 8 g, beim Pferd etwa 4 g. Von Schmalz (weiß) muß man etwa 50 g verarbeiten. Aus gelben Schmalzen, die bei hoher Temperatur gewonnen sind, lassen sich reaktionsfähige Proteine nicht mehr gewinnen.

Außer dem Knochenmark ist nach STEFFENHAGEN und CLOUGH auch die kompakte Rindensubstanz frischer Knochen für derartige Untersuchungen verwendbar, wenn man die Knochen hinreichend zerkleinert und das erhaltene Pulver zunächst durch Benzin vom Fett befreit.

Zur Unterscheidung von Därmen empfiehlt MÜLLER<sup>3</sup> von den gründlich gewaschenen und etwa 5 Minuten in Wasser von 40° gequollenen Därmen 20 g fein zerhackt mit der doppelten Menge Kochsalzlösung auszuziehen. Nach UHLENHUTH ist bei frischen Därmen nach dem Auswaschen zunächst die Schleimhaut zu entfernen.

#### d) Fischfleisch.

Die Untersuchung von Fischfleisch auf seine Herkunft kann ebenfalls mit Hilfe der Präcipitinreaktion erfolgen (NERESHEIMER), wobei besonders die Verwandtschaftsreaktionen zu beachten sind. Auch für alle anderen Fleischarten ist das Verfahren brauchbar. YOSHINAGA konnte z. B. auf diese Weise eine Verfälschung von Schildkrötenfleisch mit Froschfleisch feststellen.

### B. Unterscheidung von Milcharten und Milchprodukten. Nachweis von löslichen Caseinpräparaten.

Antisera gegen Milchprotein, die man mit BORDET als „Lactosera“ bezeichnet, lassen sich durch Injektion von Milch erzeugen (WASSERMANN und SCHÜTZE, UHLENHUTH u. a.). Eine Besonderheit der Milch liegt darin, daß die spezifischen Antigene durch Kochen nicht so beeinträchtigt werden, wie bei anderen Protein-

<sup>1</sup> UHLENHUTH, HÜNE: Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1908, 28, 498.

<sup>2</sup> FIEHE: Z. 1908, 16, 512.

<sup>3</sup> MÜLLER: Zeitschr. Fleisch- u. Milchhyg. 1908, 19, 10.

lösungen. Es lassen sich vielmehr auch mit Hilfe von gekochter Milch Antisera, die gegen rohe und gekochte Milch reagieren, gewinnen. Ebenso kann man in Milch, die längere Zeit gekocht war — UHLENHUTH erhitzte sogar eine halbe Stunde im Autoklaven auf  $114^{\circ}$  — noch eine unverminderte Präcipitinreaktion erhalten. Während mit roher Milch erzeugte Antisera nach den Erfahrungen von UHLENHUTH und HÄNDEL<sup>1</sup> sowie GRÄTZ<sup>2</sup> auch mit homologem Blutserum reagieren, fanden KUDICKE und SACHS<sup>3</sup>, daß mit gekochter Milch erzeugte Antisera, sog. Coctolactosera, wenigstens im Komplementbindungsversuch nur mit Milch, aber nicht mit Blutserum eine Reaktion geben.

Bei der Ausführung der Präcipitinreaktion in Milch muß man auf die Klarheit des Antigens verzichten, weil Milch auch nach der Filtration durch BERKEFELD-Filter trübe ist, ein Umstand, der bei schwächeren Reaktionen sehr störend wirken kann.

M. JORDANOFF<sup>4</sup>, der gemeinsam mit KOSCHUCHAROFF die biologischen Methoden zwecks Unterscheidung verwandter Milcharten (Kuh-, Büffel-, Schaf- und Ziegenmilch) durchprüfte, fand, daß die meisten der erhaltenen Lactosera unspezifisch waren.

In Anlehnung an das Absättigungsverfahren nach CASTELLANI zur Beseitigung unspezifischer Antikörper, das für Milch präcipitierende Sera u. a. auch von GAEHTGENS<sup>5</sup> als brauchbar empfohlen wurde, verfahren sie schließlich folgendermaßen:

Das präcipitierende Lactosera verschiedener Versuchstiere — gewonnen durch 5malige intravenöse Behandlung mit je 5 ccm Milch im Laufe von 10 Tagen — wird zusammengemischt und mit 5‰ Carbolsäure konserviert. In eine Reihe von kleinen Reagensgläsern gibt man zu je 1 ccm Mischlactosera 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 ccm der zum Absättigen dienenden Milch und schüttelt im Laufe von 30–60 Minuten 2–3mal je eine Minute gut durch. Nach Ablauf der „Paraprecipitation“ wird zentrifugiert und auf dem Objektträger eine Probereaktion nach der unten beschriebenen Technik ausgeführt. Auf diese Weise wird festgestellt, bei welcher Absättigungsstufe die Beseitigung der unspezifischen Antikörper vollständig ist. Nach dieser Vorprüfung mischt man die ganze Serummenge mit der entsprechenden Milchmenge, schüttelt, läßt längere Zeit kühl stehen, zentrifugiert und filtriert das so gewonnene Lactosera (jetzt als Lactotest bezeichnet) durch ein Bakterienfilter.

**Untersuchungstechnik.** Man bringt auf einen Objektträger (je nachdem man auf eine oder mehrere Milcharten prüfen will) 1–4 Einzeltropfen der zu untersuchenden Milch, gibt auf jeden Tropfen 2–3 Tropfen von einem Lactotest (Kuh-, Büffel-, Schaf-, Ziegen-Lactotest) und rührt jeden Tropfen mit einem Glasstäbchen um. Unter leichtem Schwenken des Objektträgers beobachtet man dann innerhalb 2–5 Minuten den Ablauf der Reaktion. Bei positiver Reaktion tritt eine Ausflockung der Milch ein, wobei sich die Flüssigkeit klärt. Bei negativer Reaktion bleibt der Tropfen trübe. Zu empfehlen ist die Prüfung unter dem Mikroskop.

Beim Vorliegen einer Milchart ist die Reaktion nur in dem Tropfen mit dem entsprechenden Lactotest positiv, andernfalls tritt in mehreren Tropfen eine Reaktion ein<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> UHLENHUTH u. HÄNDEL: Zeitschr. Immunitätsforsch. 1910, 4, 761.

<sup>2</sup> GRÄTZ: Zeitschr. Immunitätsforsch. 1911, 9, 677.

<sup>3</sup> KUDICKE u. SACHS: Zeitschr. Immunitätsforsch. 1914, 20, 316.

<sup>4</sup> M. JORDANOFF: Zeitschr. Fleisch- u. Milchhyg. 1932, 42, 300.

<sup>5</sup> GAEHTGENS: Arch. Hygiene 1928, 100, 82.

<sup>6</sup> SCHLOSSBERGER (Reichsgesundh.-Bl. 1934, 9, 84) konnte die Brauchbarkeit des Verfahrens zur Unterscheidung von Frauen-, Kuh- und Ziegenmilch bestätigen.

Die Lactoteste sind für die Praxis nur brauchbar, wenn die Ausflockung bei der homologen Milchart innerhalb 1—3 Minuten abläuft und bei den heterologen Milcharten auch nach einer Stunde noch keine Ausflockung eingetreten ist.

Joghurt und andere Sauermilch lassen sich nach dem gleichen Verfahren prüfen, wenn man zuvor die Kolloidlösung des Caseins wieder herstellt, was durch Neutralisieren mit 0,1 N.-Lauge gelingt.

Zur Differenzierung der Butterarten werden 100—150 g Butter in einem Zylinder bei 50—60° geschmolzen. Das Fett wird von dem abgeschiedenen Käsestoff abgossen, dieser bei 40—50° mit 0,1 N.-Lauge neutralisiert, worauf man noch warm 15 Minuten zentrifugiert. Die hierbei entstehende milchähnliche Kolloidlösung des Caseins wird zur Prüfung mit besonders empfindlichen Lactotesten verwendet.

Käse. Zur Unterscheidung verschiedener Käsearten verwendete GAETHGENS<sup>1</sup> nach dem Verfahren von KISTER und WEICHARDT<sup>2</sup> abgesättigte Antisera. Zur Absättigung wurden 5 ccm Hammelantiserum mit 0,5 ccm Rinder serum und ebenso 5 ccm Rinderantiserum mit 0,5 ccm Hammel serum vermischt und 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Nach dem Abzentrifugieren der entstandenen Präcipitate wurde das überstehende klare Antiserum gegen fallende Mengen des homologen und heterologen Serums im Präcipitationsversuch ausgewertet. Im allgemeinen waren schon nach einmaliger Behandlung mit dem heterologen Antigen die übergreifenden Präcipitine hinreichend beseitigt. Erforderlichenfalls wurde die Vorbehandlung mit dem heterologen Antigen wiederholt. Die so abgesättigten Antisera dienten dann zur Prüfung der in folgender Weise bereiteten Käseextrakte: 20—30 g fein zerkleinerter Käse wurde in 50 ccm 0,85%iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt und unter Zusatz von etwas Chloroform oder 0,5% Carbolsäure bei Eisschranktemperatur extrahiert. Von manchen Käsen ließen sich schon am folgenden Tage reaktionsfähige Auszüge erhalten, von anderen erst nach mehreren Tagen; am besten bewährten sich Extrakte, die 4 Tage gestanden hatten. Waren die Auszüge nach dem Filtrieren noch opaleszierend, so wurden sie mit Äther geschüttelt und nochmals filtriert. Die Filtrate wurden in der üblichen Weise auf ihren Proteingehalt geprüft, nötigenfalls auf neutrale oder schwach saure Reaktion gebracht und dann in steigenden Verdünnungen gegen verschiedene präcipitierende Antisera untersucht. Die Beobachtungsdauer wurde bis auf 1/2 Stunde, in einzelnen Fällen auch länger ausgedehnt. Nach diesem Verfahren war es möglich, in fast allen Fällen die Proteinart der untersuchten Käseproben zu bestimmen.

Caseinenthaltende Wurstbindemittel. Lösliche Caseinpräparate spielen als Wurstbindemittel eine Rolle. Die im Handel befindlichen Wurstbindemittel enthalten in der Regel Milcheiweiß in Form von Magermilchpulver oder, was noch häufiger ist, leicht lösliche Caseinpräparate vom Charakter des Plasmon (Casein-Natrium-Verbindung). Während die Herstellung eines brauchbaren Milchprotein-Antiserums mit Hilfe von Trockenmilch bisher nicht gelungen ist, konnten GRIEBEL und MAASS<sup>3</sup> durch Injektion einer Plasmonlösung — wobei jeder Injektionsdosis 1 ccm einer 1%igen Bleiacetatlösung zugesetzt wurde — ein spezifisches Plasmon-Antiserum vom Titer 1:10000 erhalten. Mit Hilfe dieses Serums war es möglich, einen Zusatz von 1% Plasmon in der Wurst nachzuweisen<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> GAETHGENS: Arch. Hygiene 1928, 100, 82.

<sup>2</sup> KISTER u. WEICHARDT: Zeitschr. Med.-Beamte 1902, 20, 729.

<sup>3</sup> GRIEBEL u. MAASS: Z. 1932, 63, 175.

<sup>4</sup> SCHLOSSBERGER (Reichsgesundh.-Bl. 1934, 9, 85) erhielt bei Verwendung höherer Antigendosen Plasmon-Antisera vom Titer 1:25000, die gegen KRAUSE-Milchpulver (1:2500) und Walzenmilchpulver (1:250) reagierten. Für den Nachweis von Milchpulver in Würsten reichte diese Reaktionsfähigkeit jedoch nicht aus.

### C. Unterscheidung von Eiklar und Eigelb. Nachweis von Eigelb.

**Eiklar** (Weißei) und **Eigelb** lassen sich durch die Präcipitinreaktion scharf unterscheiden. Um den Dotter für die Vorbehandlung der Tiere ohne jede Beimengung von Eiweiß zu erhalten, ließ UHLENHUTH das Eigelb nach Abgießen des Eiklars in einem mit flüssiger Gelatine gefüllten Wasserglase in der Gelatine erstarren und konnte so nach Entfernung der obersten Gelatineschicht mit Hilfe einer Pipette den Dotter völlig isoliert gewinnen. Ein durch Immunisieren mit verdünnter Dotterlösung erhaltenes Dotterantiserum reagiert nicht mit einer Lösung von Eiklar und umgekehrt ein Eiklar-Antiserum nicht mit einer Dotterlösung. Dagegen ruft ein Hühnerdotter-Antiserum auch in einer Hühnerblutlösung eine Trübung hervor, wenn auch erheblich schwächer als in einer Dotterlösung.

Nach UHLENHUTH werden auch Enten- und Gänседotter durch Hühnerdotter-Antiserum erheblich präcipitiert, so daß eine Unterscheidung nach dieser Richtung nicht möglich ist. Zu den gleichen Ergebnissen kam GRÄTZ (Organ-spezifität des Eidotters).

**Teigwaren** werden zwecks Prüfung auf Eigelb nach dem Zerkleinern mit der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung über Nacht ausgezogen. Der durch ein gehärtetes Filter geklärte Auszug wird dann in verschiedenen Verdünnungen mit dem Antiserum in der üblichen Weise zusammengebracht. EMMERICH<sup>1</sup> erhielt mit den meisten der untersuchten Präparate bis zur Verdünnung 1 : 15 Proteinreaktion (Salpetersäureprobe) und schwache Präcipitation, während selbsthergestellte Nudeln noch in der Verdünnung 1 : 60 reagierten.

ARRAGON und BORNAND<sup>2</sup> erhielten mit Eiklar-Antiserum um so schneller eine Trübung, je mehr Ei die Teigwaren enthielten.

In **Eierweibrand**, der im Vakuum alkoholfrei gemacht war, konnte EMMERICH Eigelb ebenfalls mit Dotter-Antiserum nachweisen.

Bei der Untersuchung von Eigelbpräparaten lassen sich übrigens oft keine klaren Lösungen erzielen. Der positive Ausfall der Reaktion ist dann an einer der Agglutination ähnlichen flockigen Trübung zu erkennen, deren Stärke an Kontrollen mit normalem Kaninchenserum beurteilt werden muß.

Mit dem Nachweis von Eigelb in **Margarine** haben sich E. VOLLHASE, H. J. STEINBECK und E. DANIELSEN<sup>3</sup> eingehend befaßt. Angeregt durch die Versuche von FUJIWARA<sup>4</sup>, der als Präcipitinogen durch Kochen koaguliertes Protein (Serum) benutzte und empfahl, weil das so gewonnene Antiserum im allgemeinen hochwertiger und artspezifischer sei, haben die genannten zur Injektion in einem Fall auch durch Kochen koaguliertes Eigelb verwendet, das mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer feinen Emulsion verrieben war, und auf diese Weise ein Dotterantiserum vom Titer 1 : 10000 erhalten. Für die Untersuchung der Margarine geben sie folgendes Verfahren an:

50—100 g geschmolzene Margarine werden mit der gleichen Menge angewärmtem Wasser bei 50° 15 Minuten lang im Scheidetrichter geschüttelt. Nach dem Erkalten läßt man die Flüssigkeit ab, stellt sie etwa  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde in Eis und filtriert wiederholt durch ein Faltenfilter. In 5 ccm des Filtrates bestimmt man durch Titration mit 0,01 N.-Silberlösung und Kaliumchromatlösung den

<sup>1</sup> EMMERICH: Zeitschr. Immun.-Forsch. 1913, 17, 299.

<sup>2</sup> ARRAGON u. BORNAND: Chem.-Ztg. 1913, 37, 1345.

<sup>3</sup> E. VOLLHASE, H. J. STEINBECK u. E. DANIELSEN: Z. 1929, 58, 342.

<sup>4</sup> FUJIWARA: Deutsche Zeitschr. ges. gerichtl. Med. 1922, 1, 562.



Natriumchloridgehalt und verdünnt nunmehr die verbliebene Menge des Filtrates so, daß sein Natriumchloridgehalt etwa 0,85% beträgt.

Zur Ausführung der Reaktion wurden von dieser Flüssigkeit 2 ccm mit 0,2 ccm Eidotter-Antiserum in der üblichen Weise versetzt. Zur Kontrolle wird ein gleicher Versuch mit normalem Kaninchenserum angesetzt.

Nach diesem Verfahren war es möglich, flüssiges oder getrocknetes Eigelb in Margarine noch in Mengen von 0,25% nachzuweisen.

Selbst Trockeneigelb, das  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 115–120° oder 20 Stunden auf 100° erhitzt worden war, ließ sich durch die Präcipitinreaktion noch feststellen.

## D. Untersuchungen von Kaviar, Honig und Nahrungsmitteln.

**1. Kaviar.** Die Möglichkeit der Unterscheidung von Rogen und Fleisch der gleichen Fischart mit Hilfe der Präcipitinreaktion hatte zuerst UHLENHUTH gezeigt (Organspezifität). Seine Angaben wurden von verschiedenen Forschern, insbesondere von KODAMA<sup>1</sup> bestätigt, der weiter feststellte, daß man den Störrogen (Kaviar) von anderem Fischrogen (Karpfen, Rotaugen, Brassen, Schleie, Lachs, Hering, Forelle) auf diese Weise sicher unterscheiden kann. Auch in einem Gemenge von Kaviar mit anderen Fischrogen war eine Unterscheidung möglich. Durch die Präcipitinreaktion lassen sich daher Verfälschungen von Kaviar feststellen.

Als Antigene verwendete KODAMA Auszüge von 1 Teil Rogen mit 10 Teilen physiologischer Kochsalzlösung, die durch Stehen über Nacht im Eisschrank hergestellt worden waren.

**2. Honig.** LANGER<sup>2</sup> hat darauf aufmerksam gemacht, daß der Honig einen charakteristischen Bestandteil tierischen Ursprungs enthält, nämlich Bienenprotein, das aus dem Sekret stammt, das die Biene beim Verarbeiten des Nektars und Pollens im Honigmagen verwendet. Da dieses Sekret dem Bienenhonig stets annähernd in gleicher Menge beigemischt ist, schwankt auch der Gehalt reiner Honige an Bienenprotein nur in engen Grenzen. Deshalb ist die Möglichkeit gegeben, mit Hilfe der Präcipitinreaktion eine quantitative Bienenproteinbestimmung vorzunehmen, während der Gesamtproteingehalt sehr große Schwankungen aufweist.

THÖNI<sup>3</sup> hat dann festgestellt, daß die Präcipitinreaktion quantitativ verwertbare Ergebnisse liefert, wenn hochwertige Antisera Verwendung finden, von jeder Honigprobe verschiedene Verdünnungen benutzt werden und bei jeder Prüfung stets ein reiner Bienenhonig als Kontrolle mituntersucht wird. Der Kontrollhonig soll außerdem dem zu prüfenden Honig im Charakter ähnlich sein, weil die Präcipitatenmengen je nach der Honigsorte innerhalb gewisser Grenzen schwanken. So liefern Waldhonige im allgemeinen etwas kleinere Präcipitatenmengen als Blütenhonige.

Für die Gewinnung hochwertiger Bienenantisera<sup>4</sup> erwiesen sich besonders geeignet der Futterbrei aus Königinnenzellen und das sog. Bienenbrot, weil beide relativ viel Bienenprotein enthalten. Weniger hochwertige Sera lieferten Honig und Auszüge aus Bienen.

<sup>1</sup> KODAMA: Arch. Hygiene 1913, 78, 247.

<sup>2</sup> LANGER: Arch. Hygiene 1909, 71, 308.

<sup>3</sup> THÖNI: Schweizer. Mitt. Lebensm.-Unters. 1911, 2, 80; 1912, 3, 74; Z. 1913, 25, 490.

<sup>4</sup> Nach Angabe THÖNIS kann kontrolliertes Bienen-Antiserum von den amtlichen schweizerischen Untersuchungs-Anstalten beim Schweizerischen Gesundheitsamt bezogen werden.

Für die Ausführung der Untersuchung gibt THÖNI folgende Vorschrift:

Von der zu untersuchenden Probe und dem Kontrollhonig werden je 10 g abgewogen, in 40–50° warmem, abgekochtem oder sterilisiertem Wasser gelöst, mit Natriumcarbonat neutralisiert und auf je 100 ccm aufgefüllt. Aus diesen 10%igen Lösungen werden außerdem noch 2 und 1%ige Lösungen bereitet.

Diese Lösungen kommen zusammen mit dem Antiserum in geeignete Zentrifugengläser, die unter der Bezeichnung „Mellimeter nach Dr. J. THÖNI“ bei C. Desaga in Heidelberg und Bern erhältlich sind. Die Einteilung des capillaren Teiles der Mellimeter ist so gewählt, daß jeder Teilstrich 1,5 cmm entspricht.

Die Beschickung der Zentrifugengläschen erfolgt dann in folgender Weise:

|  |       |     |   |           |   |
|--|-------|-----|---|-----------|---|
| Melli-   | meter | Nr. | 1 = 1 ccm der 10%igen Kontrollhoniglösung | + 0,5 ccm | } spezifisches<br>Bienen-<br>Antiserum<br>+ 1 Tropfen<br>Toluol |
| 2 = 1 „ „ 2% „ „                                 |       |     | + 0,3 „                                   |           |   |
| 3 = 1 „ „ 1% „ „                                 |       |     | + 0,2 „                                   |           |   |
| 4 = 1 „ „ 10% „ „ Lösung des zu prüfenden Honigs |       |     | + 0,5 „                                   |           |   |
| 5 = 1 „ „ 2% „ „ „ „ „ „                         |       |     | + 0,3 „                                   |           |   |
| 6 = 1 „ „ 1% „ „ „ „ „ „                         |       |     | + 0,2 „                                   |           |   |

Nachdem sämtliche Röhrchen mit passenden Gummistopfen versehen sind, mischt man ihren Inhalt durch kräftiges Schütteln durch und läßt 5 Stunden bei 37° stehen. Danach werden die Proben 5 Minuten lang bei einer Tourenzahl von 1500 in der Minute zentrifugiert.

Gleiche oder größere Präcipitatenmengen bei dem Untersuchungsmaterial im Vergleich zur Kontrollprobe lassen auf Echtheit des Honigs schließen; wesentlich kleinere Mengen deuten auf Beimengung von Kunsthonig oder auf teilweise Denaturierung der Eiweißstoffe durch Erhitzen hin und geben zugleich einen Anhalt dafür, in welchem Maße eine Beimengung von Kunsthonig oder eine Veränderung der Proteine durch starkes Erhitzen erfolgt ist. THÖNI fand, daß erst ein Erhitzen des Bienenhonigs auf 100° während einer Stunde ein vollständiges Ausbleiben des Präcipitates zur Folge hat.

**3. Nahrungsmittel u. dgl.** Die im Handel befindlichen Proteinnahrungsmittel lassen sich in der üblichen Weise auf die Herkunft ihrer Proteine prüfen, sofern sie in physiologischer Kochsalzlösung lösliches, reaktionsfähiges Protein enthalten. So konnten UHLENHUTH und WEIDANZ im Hämato-gen und in käuflichem Hämoglobin Rinderprotein nachweisen. Dagegen gab der Fleischsaft Puro, der aus Preßsaft von frischem Ochsenfleisch hergestellt sein sollte, mit Rinderantiserum keine Reaktion, vielmehr ließ sich Hühnerprotein feststellen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen v. GRUBER und HORIUCHI sowie W. A. SCHMIDT.

Bei der Prüfung von Milchpräparaten und Eigelbpräparaten (wie Backwaren u. dgl.), die mit einem Lactoserum bzw. Eigelb-Antiserum zu erfolgen hat, sind nicht immer klare Lösungen zu erhalten. Eine positive Reaktion ist dann an einer flockigen, der Agglutination ähnlichen Ausscheidung zu erkennen, deren Stärke an Kontrollen mit Zusatz von normalem Kaninchenserum beurteilt werden muß.

Präparate, bei deren Herstellung das Proteinmolekül mehr oder weniger abgebaut (aufgeschlossen) worden ist, lassen sich durch das Präcipitinverfahren nicht mehr charakterisieren, sofern die artspezifischen Receptoren des Antigens vollständig zerstört sind. Die Aussicht auf Erfolg ist um so geringer, je weniger koagulierbares Protein noch vorhanden ist.

Liebig's Fleischextrakt, Valentines Meatjuice, Bovril enthalten nach HAILER kein fällbares Protein mehr; dementsprechend verlief auch die Präcipitinreaktion negativ.

## E. Nachweis und Unterscheidung pflanzlicher Proteine.

Die Differenzierung pflanzlicher Proteine mit Hilfe der Präcipitinmethode hat bisher nur geringe Fortschritte gemacht. Der Grund dafür ist hauptsächlich darin zu suchen, daß die mit pflanzlichen Antigenen hergestellten Antisera infolge der geringen Proteinkonzentration der Pflanzenauszüge durchweg eine wesentlich geringere Tragweite aufweisen, indem nur selten ein Titer über 3000 erreicht wird und daß selbst die Erzielung solcher relativ wenig empfindlichen Sera nicht selten Schwierigkeiten bereitet oder auch gar nicht gelingt.

**1. Cerealien, Leguminosen und andere Samen.** Die ersten Versuche wurden von KOWARSKI<sup>1</sup> angestellt, der mit Weizenalbumosen ein gegen diese sowie gegen Roggen- und Gerste-, wenig gegen Erbsen- aber nicht gegen Haferalbumosen reagierendes Antiserum erzielte. GASIS<sup>2</sup> erhielt dagegen bei quantitativen Arbeiten recht deutliche Unterschiede zwischen Roggen, Weizen, Gerste, Mais, Bohnen, Linsen und Erbsen. BERTARELLI<sup>3</sup> konnte für Bohnen, Erbsen, Linsen, Wicken nur innerhalb der Gattung wirksame Sera erhalten, die im allgemeinen bis zu Verdünnungen von 1 : 3000 bis 1 : 5000 präcipitierten, Verwandtschaftsreaktionen mit anderen Leguminosen dagegen nur bei hoher Konzentration gaben (je nach der Art bei 1 : 50 bis 1 : 400). Eine sichere Unterscheidung von Wicken- und Gerstenprotein war RELANDER<sup>4</sup> auf serologischem Wege möglich. UHLENHUTH und JUNG konnten Mohn und Hanf, aber nicht süße und bittere Mandeln durch die Präcipitation unterscheiden. THÖNI und THAYSEN<sup>5</sup> kamen zu dem Ergebnis, daß die Spezifität der gegen Roggen, Weizen und Gerste hergestellten Antisera bedeutend gesteigert werden kann, wenn man nicht das Gesamtprotein, sondern nur einzelne der durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat erhaltenen Proteine für die Immunisierung verwendet. BECKER<sup>6</sup> konnte in Mehl und Kleieproben den Nachweis von Kornrade Beimengungen mit Hilfe des Präcipitinverfahrens erbringen.

MESSNER<sup>7</sup> benutzte mit Erfolg ein Ricinus-Antiserum, um in verfälschten Futtermitteln Ricinussamen nachzuweisen.

Die Untersuchungen von MAGNUS und FRIEDENTHAL<sup>8</sup>, die in erster Linie auf die Feststellung von Verwandtschaftsverhältnissen im Pflanzenreich ausgingen, haben gezeigt, daß nicht nur eine sichere Unterscheidung verschiedener Familien, sondern auch nahe verwandter Arten durch die Präcipitinmethode möglich ist. Auch GOHLKE<sup>9</sup> wandte die Präcipitinreaktion weniger zur Differenzierung nahestehender Arten als zum Nachweis ihrer Verwandtschaft an. Hierfür erwies sich neben der Präcipitin- auch die Konglutininreaktion brauchbar, die die Grundlage der einschlägigen Arbeiten von MEZ und seinen Schülern bildet. Einer Nachprüfung haben diese Untersuchungen übrigens nicht standgehalten (BÄRNER, HELWIG, GILG und SCHÜRHOFF u. a.).

**2. Marzipan und Schokolade.** Da die mikroskopische Erkennung verschiedener fettreicher Samen in Marzipan- und Schokoladewaren oft auf unüberwindliche Schwierigkeiten stößt, wenn ein bestimmter Zerkleinerungsgrad überschritten wird, versuchten GRIEBEL und MAASS<sup>10</sup> den Nachweis dieser

<sup>1</sup> KOWARSKI: Deutsch. Medizin. Wochenschr. 1901, 27, 442.

<sup>2</sup> GASIS: Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr 7.

<sup>3</sup> BERTARELLI: Zentralbl. Bakteriol. II. Abt. 1904, 11, 8, 45.

<sup>4</sup> RELANDER: Zentralbl. Bakteriol. II. Abt. 1908, 20, 518.

<sup>5</sup> THÖNI u. THAYSEN: Schweizer. Mitt. Lebensm.-Unters. 1914, 5, 317.

<sup>6</sup> BECKER: Zentralbl. Bakteriol. II. Abt. 1918, 48, 417.

<sup>7</sup> MEISSNER: Mitt. Kais.-Wilh.-Inst. Landw. Bromberg 1909, 1.

<sup>8</sup> MAGNUS u. FRIEDENTHAL: Ber. Deutsch. Botan. Ges. 1906, 24, 601; 1907, 25, 242, 337; 1908, 26, 532.

<sup>9</sup> GOHLKE: Dissert. Königsberg 1913.

<sup>10</sup> GRIEBEL u. MAASS: Z. 1932, 63, 166.

Samen mit Hilfe des Präcipitinverfahrens zu führen. Es gelang ihnen Antisera gegen Mandel-, Aprikosen-, Haselnuß-, Erdnuß-, Anacardia- und Pinien-samen herzustellen. Die Mandel- und Aprikosenkern-Antisera reagierten beide sowohl gegen Mandel- als auch gegen Aprikosenkernauszüge in gleicher Stärke, im übrigen waren sie spezifisch. Eine Differenzierung von Mandel und Aprikosenkernen gelang hierbei auch nicht mit Hilfe der Absättigungsmethode. Die übrigen Antisera waren artspezifisch. Ein brauchbares Walnußantiserum wurde nicht erhalten.

Zwecks Herstellung der Proteinlösungen (Antigene) für die Vorbehandlung wurden die sorgfältig von der gerbstoffhaltigen Samenschale befreiten Samenkerne zunächst fein gerieben, durch Extraktion mit Äther vom Fett befreit, und schließlich mit 70%igem Alkohol behandelt, um Zuckerstoffe und Pflanzensäuren nach Möglichkeit zu beseitigen. Die so vorbereiteten Pulver wurden dann nach dem Trocknen im Exsiccator mit physiologischer Kochsalzlösung bei 37° extrahiert. Bei dem Pulver aus gerösteten Erdnüssen war eine Temperatur von 100° notwendig, um genügende Mengen Protein in Lösung zu bringen. Beim Walnußpulver genügte auch dieses Verfahren nicht, so daß zu 0,1%iger Natronlauge gegriffen wurde. Die durch Filtrieren geklärten Auszüge dienten zur Immunisierung der Tiere in üblicher Weise.

Zur annähernden Schätzung des Proteingehaltes der Antigenverdünnungen zwecks Titerstellung der erhaltenen Antisera dienten in folgender Weise hergestellte Standardlösungen: Je 1 ccm normales Kaninchenserum wurde in verschiedenen Verdünnungen (1:200 bis 1:3500) mit je 1 ccm ESBACHS Reagens versetzt und in Röhrechen eingeschmolzen. Durch Vergleich dieser Trübungen mit den Reaktionen, die in den Samenauszügen auf Zusatz von ESBACHS Reagens entstanden, war für die Herstellung der Antigenverdünnungen eine Grundlage gegeben.

Der Titer der gewonnenen Antisera betrug 1:1000 bis 1:3000. Das Antiserum gegen Walnüsse, das mit Hilfe eines Lauge-Walnuß-Antigens erzeugt wurde, war deswegen nicht brauchbar, weil auch die aus normalem Kaninchenserum bestehende Kontrolle mit dem neutralisierten Lauge-Walnuß-Antigen in gleicher Weise wie das Antiserum reagierte.

Mit Hilfe der erhaltenen Antisera konnten Haselnuß-, Pinien- und Anacardiensamen in Marzipan und Persipan nachgewiesen werden. Ebenso war der Nachweis von fein gemahlenden Mandeln oder Haselnüssen (5%) in Schokoladen möglich. Die Herstellung der Auszüge geschah hierbei in folgender Weise: Je 10 g Marzipan oder Persipan wurden mit 70%igem Alkohol vom Zucker und mit Äther vom Fett befreit, die Rückstände sodann im Exsiccator getrocknet und mit physiologischer Kochsalzlösung bei 37° extrahiert. Die mit Magnesiumoxyd neutralisierten und klar filtrierten Auszüge dienten sodann zur Herstellung der Antigene in den Verdünnungen 1:200 bis 1:1000.

In gleicher Weise erfolgte die Vorbehandlung der zu prüfenden Schokolade: Je 1 g der zucker- und fettfreien trockenen Extraktionsrückstände wurde mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung bei Siedehitze ausgezogen. Nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur wurden die Auszüge mit Magnesiumoxyd neutralisiert und hierauf filtriert. Die weitere Klärung der rötlich gefärbten Filtrate erfolgte mit Hilfe von doppelten, gehärteten Filtern.

## F. Quantitative Bestimmungen mittels des Präcipitinverfahrens.

Das quantitative Präcipitinverfahren nach THÖNI zur Untersuchung von Bienenhonig wurde bereits (S. 696) beschrieben.

Die von NUTTAL entdeckte, von SCHULZ<sup>1</sup> für die Nahrungsmittelkontrolle vorgeschlagene quantitative Bestimmung der Proteinarten mittels des Präcipitinverfahrens beruht auf folgenden Grundsätzen:

Bestimmte Verdünnungen einer Proteinlösung werden mit Antiserum versetzt, und es wird festgestellt, in welcher Verdünnung nach einer bestimmten Zeit eine Trübung eintritt. Von dem zu prüfenden Extrakt werden dann ebenfalls progressive Verdünnungen mit Antiserum versetzt. Die Konzentration der Verdünnung, in der nach derselben Zeit eine Trübung eintritt, entspricht der der Testlösung. Aus dem Gewichte des Fleisches, der Menge der Extraktionsflüssigkeit läßt sich der Gehalt des Untersuchungsmaterials an dem betreffenden Proteinstoff feststellen. Bedingung dafür ist allerdings, daß in der zu prüfenden Flüssigkeit auch alle löslichen Proteine der in Betracht kommenden Fleischsorten oder anderer Gegenstände gelöst sind und daß in gleich großen Stücken einer Fleischsorte gleiche Mengen löslicher Proteine vorhanden sind. UHLENHUTH, WEIDANZ und WEDEMANN weisen mit Recht darauf hin, daß diese Vorbedingungen nur bei Blutgemischen und bei Fleischgemengen aus gleich frischen und mageren Fleischsorten annähernd erfüllt sind, nicht aber bei Würsten. Außerdem kommt für die rechtliche Beurteilung die Menge des in einer Wurst enthaltenen Pferdefleisches für gewöhnlich nicht in Betracht.

Hinsichtlich der Ausführung einer solchen quantitativen Bestimmung sei auf die Arbeit von SCHULZ verwiesen.

## IV. Methode der Komplement-Ablenkung oder -Bindung.

Das Verfahren ist zuerst von NEISSER und SACHS für die biologische Proteindifferenzierung, insbesondere als Ergänzung und zur Kontrolle des UHLENHUTHschen Präcipitinverfahrens empfohlen worden. Die Methode ist viel empfindlicher als die Präcipitinreaktion, in ihrem Wesen aber noch keineswegs geklärt. Sie beruht auf der Beobachtung von GENGOU, daß beim Zusammenkommen von Präcipitins serum mit präcipitinogenen Stoffen die Komplemente (vgl. S. 673) im Serum verschwinden. BORDET und GENGOU, NEISSER und SACHS u. a. nahmen an, daß bei der Immunisierung mit Proteinen noch spezifische Amboceptoren entstehen, die bei Gegenwart von Eiweiß, mit dem sie sich verbinden können, die Komplemente an sich reißen und so dem Nachweis entziehen.

Die erfolgte Komplementbindung wird durch das Ausbleiben der Hämolyse nachgewiesen. Der Zusammenhang hierbei ist folgender:

Bei der Immunisierung mit artfremdem Blut gewinnt das Serum des Versuchstieres spezifische hämolytische Eigenschaften. Zustande kommt die Hämolyse durch das Zusammenwirken zweier Komponenten des Immunsersums, nämlich des eigentlichen Antikörpers (Amboceptor) und eines Ergänzungstoffes, der deshalb die Bezeichnung „Komplement“ erhalten hat. Dieses Komplement ist hitzeempfindlich (thermolabil). Wird nämlich das betreffende hämolsierende Serum zuvor 30 Minuten auf 55—56° erwärmt, so geht die hämolsierende Wirkung durch Zerstörung des Komplements verloren. Sie kann jedoch wieder-

<sup>1</sup> SCHULZ: Z. 1906, 12, 257.

hergestellt werden durch Zusatz einer geringen Menge des gleichen oder eines anderen nicht erhitzten Serums, auch wenn dieses für sich keine hämolytischen Eigenschaften hat. Eine Mischung von hämolytischem Immuns Serum mit den homologen roten Blutkörperchen nennt man ein hämolytisches System. Das Zustandekommen der Hämolyse wird nun verhindert, wenn in den Komplex des hämolytischen Systems (Amboceptor + Komplement + homologe Blutkörperchen) zuvor Gruppen eintreten, die ebenfalls Komplement zu binden vermögen. Dies ist z. B. der Fall, wenn eine Mischung von Proteinantigen und dem dazugehörigen präcipitierenden Antiserum hinzugefügt wird, da präcipitierende Antisera regelmäßig solche komplementbindende Antikörper enthalten. Bringt man das betreffende präcipitierende Antiserum jedoch nicht mit dem homologen, sondern mit einem heterologen Antigen zusammen, so wird das Komplement nicht verbraucht, sondern es ergänzt das hämolytische System und bringt die Blutkörperchen zur Auflösung.

Die Hämolyse ist hier also ein Farbenindicator zur Feststellung, ob Antigen und Antiserum der untersuchten Mischung homolog oder heterolog sind.

In der Praxis benutzt man als hämolytisches System im allgemeinen — in einer durch den Vorversuch festgestellten wirksamen Verdünnung — das inaktivierte (30 Minuten auf 55° erhitzte) Serum eines Kaninchens, das nach Vorbehandlung mit gewaschenen Hammelblutkörperchen Immunnämolytin für Hammelblutkörperchen (Amboceptor) gebildet hat und eine 5%ige Aufschwemmung von gewaschenen Hammelblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung. Als Komplement für dieses System dient eine 10%ige Verdünnung von frisch gewonnenem Meerschweinchenserum, das besonders reich an dem Ergänzungsstoff ist.

Bei der Ausführung des Versuches bringt man eine wäßrige Lösung des zu untersuchenden Proteins in abgestuften Verdünnungen mit den in Frage kommenden Eiweißantiseren von bekannter und spezifischer Wirkung zusammen, fügt Komplement hinzu und prüft, nachdem die Gemische eine Stunde im Brutschrank gestanden haben, durch Zusatz des hämolytischen Systems, ob durch das Antiserum bzw. durch welches der Antisera Komplementbindung — also Ausbleiben der Hämolyse — verursacht wird.

Obwohl diese Methode viel empfindlicher ist als die Präcipitinreaktion und den Nachweis spezifischer Proteine noch in außerordentlich großen Verdünnungen gestattet, ist sie doch für die Praxis der Lebensmitteluntersuchung aus verschiedenen Gründen wenig geeignet.

UHLENHUTH, WEIDANZ und WEDEMANN<sup>1</sup> sowie WEIDANZ und BORCHMANN<sup>2</sup> weisen nämlich darauf hin, daß die Komplementablenkung außer durch spezifische Stoffe auch durch eine Anzahl indifferenten Stoffe wie Salpeter, Präservesalz, Pökellake, Gewürze u. a. hervorgerufen wird. Zwar kann die Wirkung dieser Stoffe durch starke Verdünnung ausgeschaltet werden, doch ist dies bei an sich schon sehr dünnen Eiweißlösungen, wie man sie aus gekochten Würsten erhält, oft nicht angängig. Deswegen halten es die genannten für sehr bedenklich, bei der Untersuchung von Fleischwaren das Gutachten allein auf das Ergebnis der Komplementablenkung zu stützen. Höchste Vorsicht ist auch bei Blutuntersuchungen geboten, weil Schweiß und alle möglichen anderen Stoffe eine Ablenkung bewirken. Jedenfalls darf der positive Ausfall des Ablenkungsverfahrens beim Ausbleiben der Präcipitinreaktion für das Gutachten nicht ausschlaggebend sein.

<sup>1</sup> UHLENHUTH, WEIDANZ u. WEDEMANN: Arb. Kais. Gesundh.-Amt 1908, 28, H. 3.

<sup>2</sup> WEIDANZ u. BORCHMANN: Arb. Kais. Gesundh.-Amt 1908, 28, 477.

Da das Komplementablenkungsverfahren außerdem etwa zehnmal soviel Zeit in Anspruch nimmt als die Präzipitinreaktion, ferner erheblich mehr Reagenzien verlangt — das Zusammenwirken von 5 Komponenten macht eine größere Anzahl Kontrollen erforderlich — und daher ziemlich teuer ist, so liegt zur Zeit kein Grund vor, das für die Praxis völlig ausreichende Präzipitinverfahren durch das der Komplementablenkung zu ersetzen.

Letzteres kann höchstens in wichtigen Fällen zur Bestätigung herangezogen werden. Von einer Beschreibung der Ausführungsweise kann deshalb hier abgesehen werden. Genaue Angaben darüber findet man z. B. in der oben zitierten Arbeit von WEIDANZ und BORCHMANN.

## V. Anaphylaxieversuch.

Wenn man Versuchstieren wiederholt artfremdes Protein einspritzt, so reagieren sie auf die zweite und folgende Einspritzung gewöhnlich anders als auf die erste, eine Erscheinung, die man nach v. PIRQUET als allergische Reaktion bezeichnet. Unter bestimmten Versuchsbedingungen reagieren vorbehandelte (sensibilisierte) Tiere auf eine weitere Injektion desselben Proteins nunmehr unter sehr charakteristischen, meist stürmisch einsetzenden und häufig rasch zum Tode führenden Krankheitserscheinungen. Man bezeichnet den durch die Sensibilisierung herbeigeführten Zustand als Überempfindlichkeit oder Anaphylaxie (aktive Anaphylaxie). OTTO hat gezeigt, daß durch einmalige Injektion des Serums solcher aktiv überempfindlichen Tiere die Anaphylaxie auch auf andere Tiere übertragen werden kann (passive Anaphylaxie). Hieraus geht hervor, daß es sich um eine Antikörperbildung handelt.

Die von ARTHUS gemachte Beobachtung, daß der ganzen Erscheinung eine bestimmte Spezifität zukommt, weiter die Feststellung, daß für die erste Injektion bereits minimale Proteinspuren genügen, um den erwähnten Zustand herbeizuführen und schließlich die von ROSENAU und ANDERSON, UHLENHUTH und HAENDEL sowie anderen Forschern gemachte Beobachtung, daß es auch mit erhitztem (zum Teil denaturiertem) Protein gelingt, Tiere für das entsprechende native Protein überempfindlich zu machen, lassen die Anaphylaxiereaktion für diagnostische Zwecke besonders wertvoll erscheinen.

In der Praxis wird in der Weise verfahren, daß man Versuchstiere (Meerschweinchen) durch einmalige oder mehrmalige Einspritzung kleiner Dosen des auf seine Artzugehörigkeit zu prüfenden Proteins empfindlich macht (sensibilisiert) und dann nach Ablauf einer bestimmten zur Ausbildung der Immunitätserscheinungen erforderlichen Zeit durch Injektion von bekannten Proteinarten prüft, gegen welches dieser Antigene eine Überempfindlichkeit eingetreten ist. Die Sensibilisierung erfolgt in der Regel durch subcutane oder intraperitoneale Einspritzung kleiner Dosen, die Auslösung der Erscheinungen am besten durch Einführung größerer Antigen Dosen in die Blutbahn (intravenös oder intrakardial).

Da zur Erzielung einer aktiven Anaphylaxie etwa 3—4 Wochen Zeit erforderlich sind, wird man häufiger gezwungen sein, von der passiven Überempfindlichkeit Gebrauch zu machen, die bereits nach 1—2 Tagen eintritt. Wenn es sich z. B. um den Nachweis von Pferdefleisch handelt, spritzt man einem Meerschweinchen 1—2 ccm eines präcipitierenden Pferdeantiserums intraperitoneal ein und prüft dann nach 24 oder 48 Stunden durch intravenöse Einspritzung des zu untersuchenden Proteins, ob eine spezifische Überempfindlichkeit vorhanden ist. Voraussetzung ist hierbei jedoch, daß nicht eine zu wenig Protein enthaltende Lösung zur Einspritzung gelangte.

Die Technik des Anaphylaxieversuchs ist nicht einfach. Das Verfahren ist viel zeitraubender als die Präcipitinreaktion und außerdem ziemlich kostspielig, da für jeden Versuch eine Anzahl Tiere (4—6) erforderlich sind. Nach UHLENHUTHS Erfahrungen kann die Anaphylaxiereaktion zudem bei gerichtlichen Untersuchungen höchstens zur Ergänzung und zur Kontrolle des Präcipitinverfahrens herangezogen werden. Aus allen diesen Gründen kommt das Verfahren für die praktische Lebensmitteluntersuchung allgemein zur Zeit jedenfalls nicht in Betracht, obwohl es wegen seiner außerordentlichen Empfindlichkeit, die diejenige der Komplementbindung noch übertrifft, in Sonderfällen ausgezeichnete Dienste leisten kann. Es erübrigt sich daher die anaphylaktischen Erscheinungen und das Verfahren im einzelnen hier näher zu beschreiben. Genaue Angaben findet man z. B. bei UHLENHUTH und WEIDANZ<sup>1</sup> sowie bei MANTEUFEL<sup>2</sup>.

## VI. Verfahren der Amboceptorbindung durch kochbeständige (heterogenetische) Receptoren von SACHS und GEORGI.

Das Verfahren beruht auf der von FORSSMAN gemachten Beobachtung, daß Hammelblutkörperchen und die Organzellen bestimmter Tierarten gleichartige Receptoren besitzen, so daß nach Vorbehandlung von Kaninchen mit diesen Antigenen Hämolyse (Amboceptoren) gegen rote Hammelblutkörperchen entstehen, während die gleichen Organzellen anderer Tierarten diese Eigenschaft nicht zeigen. Durch Vorbehandlung (Absättigung) solcher Antisera mit den zur Impfung benutzten Organen oder den Organzellen bestimmter anderer Tierarten werden die Amboceptoren gebunden, so daß nach Zusatz von Hammelblut und Komplement keine Hämolyse mehr eintritt.

Die Fähigkeit heterogenetische Hammelhämolyse zu binden, kommt den Organen von Meerschweinchen und Pferd (außerdem Hund, Katze, Huhn, Schildkröte, Kamel, Walfisch) zu, sie fehlt bei den Organzellen von Kaninchen (außerdem Rind, Ziege, Schaf, Hirsch, Schwein, Ratte, Mensch, Gans, Taube, Hering, Kabeljau, Schellfisch).

DOERR und PICK stellten weiter fest, daß die gemeinsamen Receptoren in den Organzellen kochbeständig sind. Besonders diese Kochbeständigkeit veranlaßte SACHS und GEORGI, den Nachweis der Hammelblutreceptoren bindenden Organreceptoren zu diagnostischen Zwecken zu verwenden. Das Vorkommen des koktostabilen Antigens in Pferdeorganen — während es in Rind- und Schweineorganen fehlt — gab ihnen die Anregung zu prüfen, ob sich der Nachweis dieser kochbeständigen Receptoren nicht zur Erkennung von gekochten Fleischwaren (Wurst) eignen würde, wenn die gewöhnlichen Verfahren versagen. Nachdem dieser Nachweis an Pferdewurst gelungen war, sättigten sie ein Kaninchenantiserum, das infolge wiederholter Immunisierung des Tieres mit Meerschweinchen- oder Pferdeorganzellen (Aufschwemmungen von zerkleinerten Nierenzellen in physiologischer Kochsalzlösung) hämolytische Antikörper gegen Hammelblutkörperchen gebildet hatte, mit einer Aufschwemmung der zu untersuchenden gekochten Fleisch- oder Wurstmasse ab. Bestand das Material aus Rind- oder Schweinefleisch, so behielt das Antiserum seine hämolytische Eigenschaft, enthielt das Material Pferdefleisch, so büßte es seine hämolytische Wirkung ein.

<sup>1</sup> UHLENHUTH u. WEIDANZ: S. 175f.

<sup>2</sup> MANTEUFEL: ABDERHALDEN'S Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 8, 2. Hälfte, S. 1849.



Die Reaktion ist also lediglich eine Gruppenreaktion: Rind- und Schweinefleisch usw. auf der einen Seite, Pferde-, Hunde-, Katzenfleisch usw. auf der anderen Seite.

Selbst bei 15 Minuten langem Kochen konnte von SACHS und GEORGI noch 2% Pferdefleischbeimengung nachgewiesen werden. Die Probe kann nach SACHS und GEORGI versagen, wenn Hunde- oder Ziegenblut in der Wurst vorhanden ist, desgleichen wenn vom Pferd nur das Blut vorhanden ist.

Während die theoretischen Grundlagen des Verfahrens bei der Nachprüfung von anderer Seite (GAETHGENS u. a.) als richtig bestätigt wurden, konnte die praktische Brauchbarkeit in der jetzigen Form nicht anerkannt werden. Es erübrigt sich daher hier auf die Technik der Methode näher einzugehen.

Auch das Verfahren von SACHS und GUTH, das auf der Ausflockung alkoholischer Fleischextrakte durch isogenetische oder heterogenetische Schafblutamboceptoren beruht, und im Prinzip die gleiche Anwendungsmöglichkeit bietet, wie das Verfahren von SACHS und GEORGI, dürfte vorläufig für die Praxis nicht in Betracht kommen.

#### Buch-Literatur.

DOLD: In E. ABDERHALDEN'S Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Abs. 13, Teil 2, H. 1, 1921. — v. DUNGERN: Die Antikörper. Jena 1903. — KOLLE, KRAUS u. UHLENHUTH: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl. Jena. — MANTEUFEL: In E. ABDERHALDEN'S Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 4, Teil 8, 2. Hälfte. Berlin u. Wien. — UHLENHUTH: In GOTTSCHLICH: Handbuch der hygienischen Untersuchungsmethoden, Bd. 2. Jena 1927. — UHLENHUTH-WEIDANZ: Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909.

# Enzyme.

Von

Professor DR. E. WALDSCHMIDT-LEITZ und DR. A. K. BALLS-Prag.

Mit 24 Abbildungen.

## I. Allgemeine Methodik der Enzymbestimmung und Enzymreinigung.

### A. Grundlagen der Enzymbestimmung.

Enzyme mißt man, nicht wie es in der organischen und anorganischen Chemie üblich ist, gewichtsmäßig oder mittels einer spezifischen Reaktion, sondern an ihren Wirkungen. Die erste Voraussetzung für die Messung einer Enzymwirkung ist der Besitz einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung des noch vorhandenen unangegriffenen Substrates oder der entstandenen Reaktionsprodukte. Diese Methoden können gravimetrischer, titrimetrischer, gasvolumetrischer, optischer oder anderer Art sein je nach der Natur des Substrates und seiner Spaltprodukte; bei der Besprechung der einzelnen Enzyme wird darauf noch näher einzugehen sein. Für die quantitative Messung einer Enzymwirkung ist ferner die Kenntnis einmal der Beziehung zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit und dann die Kinetik der Enzymreaktion von ausschlaggebender Bedeutung. Die Kinetik der Enzymreaktion ist nur in den wenigsten Fällen monomolekular und läßt sich nach der Gleichung  $K = \frac{1}{t} \cdot \log \cdot \frac{a}{a-x}$  berechnen. Im allgemeinen wird der Bestimmung von Enzymwerten eine empirisch ermittelte Zeitumsatzkurve zugrunde gelegt. In jedem Falle ist die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark abhängig von den chemischen und physikalischen Bedingungen, in deren Milieu sie sich abspielt. Eine genaue Kenntnis und die Möglichkeit einer genauen Einhaltung dieser Bedingungen ist deshalb für die Wertbestimmung eines Enzyms unerlässlich. Auf die chemischen Bedingungen braucht hier nicht näher eingegangen werden; im theoretischen Teil (Bd. I, S. 677f.) ist davon eingehend gesprochen, und bei der Beschreibung der einzelnen Enzyme soll auf die Verhältnisse eines jeden bestimmten Falles noch eingegangen werden. Es sei nur nochmals erwähnt, daß die Berücksichtigung von Aktivierungs- und Hemmungskörpern, die vielfach schon im wechselnden Maße in den Enzymlösungen enthalten sind, ferner die Berücksichtigung der Substratkonzentration, der Konzentration etwa vorhandener Salze, von Glycerin usw. ausschlaggebende Bedeutung für eine exakte Wertbestimmung haben.

Auch die Einhaltung der physikalischen Bedingungen ist von der nämlichen Wichtigkeit. Hier ist vor allem auf die Temperatur und auf die Wasserstoffionenkonzentration zu achten; denn die Enzymwirkung ist von diesen beiden Faktoren ganz außerordentlich abhängig.

**Maße für die Enzymwirkung.** Als Maß für die Menge eines Enzyms gilt nach dem Vorschlag von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN<sup>1</sup> die „Enzymeinheit“,

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. R. KUHN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1922/23, 56, 509.

deren Definition auf der Reaktionsgeschwindigkeit beruht, mit der das Enzym unter bestimmten, sich stets gleichen äußeren Bedingungen die Umsetzung des Substrates vollzieht; sie kann sich also z. B. auf die Geschwindigkeitskonstante einer monomolekularen Reaktion beziehen, oder aus einer empirischen Kurve, die die Beziehungen zwischen Enzymmenge und Umsatz unter bestimmten Bedingungen und für eine bestimmte Reaktionszeit darstellen, abgeleitet werden. Als Maß für die enzymatische Konzentration eines Präparates — seinen Reinheitsgrad — dient der „Enzymwert“, der bestimmt ist durch die Anzahl der Enzymeinheiten in einer bestimmten Gewichtsmenge des Präparates.

**Einfluß der Temperatur.** Die Geschwindigkeit von Fermentreaktionen ändert sich mit steigender Temperatur einerseits infolge der Steigerung der Reaktionsfähigkeit des chemischen Systems, andererseits infolge der irreversiblen Schädigung des Enzyms durch Hitzeinaktivierung bei steigenden Wärmegraden. Jedes Enzym hat ein Temperaturoptimum, das gewöhnlich zwischen  $30^{\circ}$  und  $40^{\circ}$  liegt; doch ist das Temperaturoptimum in vielen Fällen abhängig von anderen Faktoren, dem  $p_{\text{H}}$ , der Gegenwart von Neutralsalzen und von Spaltprodukten. Es ist nicht unumgänglich notwendig, die Enzymmessung bei der genau optimalen Temperatur auszuführen; man zieht im allgemeinen vor, die meisten Enzyme bei einer und derselben Temperatur bei  $30^{\circ}$  oder  $37^{\circ}$  zu messen.

Zur Einhaltung einer bestimmten und während der Versuchszeit konstanten Temperatur dient ein Thermostat, dessen Temperatureinstellung mindestens eine Genauigkeit von  $\pm 0,10^{\circ}$  ermöglichen soll. Für Enzymbestimmungen ist deshalb ein Wasserthermostat mit Thermoregulierung und Rührung, der außerdem einen schnellen Temperatureausgleich ermöglicht, unerlässlich.

**Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration<sup>1</sup>.** Die Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration ist für die meisten Fälle genau untersucht. Ein Bild dieser Abhängigkeit übermitteln uns die Enzym- $p_{\text{H}}$ -Kurven (vgl. Bd. 1, S. 701). Für jedes Enzym existiert ein  $p_{\text{H}}$ -Optimum. Es ist zweckmäßig, die Wertbestimmung eines Enzyms beim optimalen  $p_{\text{H}}$  auszuführen.

Zur vergleichenden Prüfung einer Fermentwirkung ist nicht nur die Messung und Einstellung der Wasserstoffionenkonzentration erforderlich, sondern auch ihre Konstanzhaltung während des Versuches. Gemessen wird die Wasserstoffionenkonzentration entweder mittels Indicatoren oder elektrometrisch. Zur Einstellung und zur Konstanzhaltung der Wasserstoffionenkonzentration dienen die Puffer, die als automatische Regulatoren wirken und denen die Fähigkeit zur Kompensierung etwa während des Prozesses auftretender Reaktionsänderungen zukommt. Solche Puffer sind Gemische entweder von schwachen Säuren mit ihren Alkalisalzen (z. B. Essigsäure mit Natriumacetat) oder auch Gemische von primären und sekundären sauren Salzen (z. B.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Durch Verdünnen mit Wasser wird ihre Wasserstoffionenkonzentration nicht wesentlich geändert, da die  $[\text{H}^+]$  nur von dem Verhältnis Säure : Salz, nicht aber von der absoluten Menge abhängt, aber ihr Pufferungsvermögen wird herabgesetzt.

<sup>1</sup> Über die Nomenklatur mögen folgende Angaben orientieren: Die Konzentration der H-Ionen wird ausgedrückt in Gramm-Ion je Liter. Das Symbol für Konzentration der H<sup>+</sup>-Ionen ist gewöhnlich  $[\text{H}^+]$  oder  $h$ . Statt mit dem Begriff Wasserstoffionenkonzentration oder Wasserstoffzahl operiert man nach einem Vorschlag von SÖRENSEN (Biochem. Zeitschr. 1909, 21, 131; 22, 352) mit dem Begriff  $p_{\text{H}}$ , welcher definiert ist als der negative Logarithmus der Konzentration, also  $p_{\text{H}} = -\log h = \log 1/h$ .

Beispiel für die Umrechnung von  $h$  und  $p_{\text{H}}$  nach MICHAELIS (Praktikum der physik. Chemie, 3. Aufl. Berlin 1926): 1. Es sei  $h = 2 \cdot 10^{-5}$ ; dann ist  $\log h = \log 2 + \log 10^{-5}$ ;  $0,30-5 = -4,70$ ;  $p_{\text{H}} = 4,70$ . 2. Es sei  $p_{\text{H}} = 6,70$ , dann ist  $\log h = -6,70 = 0,30-7$ ;  $h = 2,0 \cdot 10^{-7}$ .

In den folgenden Tabellen sind die gebräuchlichsten Puffermischungen, deren Zusammensetzung von SÖRENSEN, MICHAELIS, CLARK u. a. angegeben wurde, zusammengestellt. Die Wahl der passenden Pufferlösung erfordert besondere Überlegung. Vor allem soll innerhalb einer Versuchsreihe, z. B. bei der Aufstellung einer  $p_H$ -Kurve nicht mit der Pufferart gewechselt werden, um den eventuellen Einfluß der Ionen auf die Enzymwirkung gleichmäßig zu gestalten. Für solche Zwecke ist die von McILVAINE<sup>1</sup> verwendete Phosphat-Citronensäure-Mischung und die von L. MICHAELIS<sup>2</sup> angegebene Acetat-Veronal-Mischung, die über einen weiten  $p_H$ -Bereich wirksam sind, besonders geeignet. Man wird sich auch überlegen müssen, nach welcher Richtung die zu erwartende Reaktionsänderung vor sich geht und danach den Puffer so wählen, daß er gerade in dieser Richtung gut wirksam ist; so ist z. B. Phosphatpuffer bei  $p_H = 8,0$  noch gut verwendbar, wenn er eine Reaktion nach der sauren Seite hin regulieren soll, nicht aber für eine Reaktion, die alkalischere Produkte entstehen läßt; denn nach der alkalischen Seite hin ist die Wirkung des Puffers sehr bald erschöpft denn nach der alkalischen Seite hin ist die Wirkung des Puffers sehr bald erschöpft.

Es ist auch wichtig, eine geeignete Pufferkonzentration anzuwenden; diese soll nicht zu groß sein, um die Enzymwirkung nicht zu hemmen oder bei der Bestimmung des Enzyms (z. B. bei einer alkalimetrischen Titration) nicht zu stören, muß aber so hoch sein, daß sie das  $p_H$  bis zum Ende des Versuchs konstant zu halten erlaubt. Die Verschiebung des  $p_H$  soll dabei nicht größer als  $\pm 0,1$  sein, was durch einen besonderen Versuch für den jeweiligen Fall festzustellen ist. Die Wirkung eines Puffers hängt von seiner Pufferkapazität ab, die je nach dem Puffergemisch, aber auch innerhalb eines Puffergemisches je nach dem  $p_H$ -Bereich verschieden ist.

Zur Herstellung gepufferter Lösungen muß man selbstverständlich von absolut reinen Präparaten ausgehen. Eine Anzahl gut gereinigter Präparate sind im Handel, so das primäre Kaliumphosphat und das sekundäre Natriumphosphat „zu Enzymstudien nach SÖRENSEN“. Wenn die Lösungen genau sein sollen, ist für ihre Herstellung kohlenstoffsaurefreies Wasser zu verwenden.

Tabelle 1. Puffermischungen nach MICHAELIS<sup>3</sup>.

| Zusammensetzung | Ammonchlorid* | Essigsäure | Milchsäure | Weinsäure  | Zusammensetzung | Ammonchlorid* | Essigsäure | Milchsäure | Weinsäure  |
|-----------------|---------------|------------|------------|------------|-----------------|---------------|------------|------------|------------|
|                 | Ammoniak      | Na-acetat  | Na-lactat  | Na-tartrat |                 | Ammoniak      | Na-acetat  | Na-lactat  | Na-tartrat |
|                 | $p_H$         | $p_H$      | $p_H$      | $p_H$      |                 | $p_H$         | $p_H$      | $p_H$      | $p_H$      |
| 1/32            | 11            | 6,22       | 5,3        | 4,5        | 2/1             | 9,19          | 4,4        | 3,5        | 2,7        |
| 1/16            | 10,7          | 5,9        | 5,0        | 4,2        | 4/1             | 8,89          | 4,1        | 3,2        | 2,4        |
| 1/8             | 10,4          | 5,6        | 4,7        | 3,8        | 8/1             | 8,58          | 3,8        | 2,9        | 2,0        |
| 1/4             | 10,1          | 5,3        | 4,45       | 3,6        | 16/1            | 8,3           | 3,3        | 2,61       | 1,7        |
| 1/2             | 9,8           | 5,0        | 4,17       | 3,3        | 32/1            | 8,0           | 3,19       | 2,3        | 1,4        |
| 1/1             | 9,5           | 4,7        | 3,8        | 3,0        |                 |               |            |            |            |

\* Die Temperaturabhängigkeit dieses Puffers ist besonders stark; bei 30° erniedrigen sich die für 20° angegebenen Werte um je 0,3. Im allgemeinen betragen die Differenzen, die bei höherer Temperatur in einer Abnahme des  $p_H$  bestehen, und besonders bei stärker alkalischen Lösungen deutlich werden, für je 10° maximal 0,1, bei niedrigem  $p_H$  erheblich weniger.

<sup>1</sup> McILVAINE: Journ. Biol. Chem. 1921, 49, 183.

<sup>2</sup> L. MICHAELIS: Biochem. Zeitschr. 1931, 234, 139.

<sup>3</sup> L. MICHAELIS: Praktikum der physikalischen Chemie. Berlin 1926.

Tabelle 2. Puffermischungen nach SÖRENSEN<sup>1</sup>.

Verwendete Lösungen: 1. 0,1 n-HCl. 2. 0,1 n-NaOH. 3. 0,1 m-Glykokoll + 0,1 n-NaCl. 4. 1/15 mol. primäres Kaliumphosphat (9,078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 1 Liter wäßriger Lösung. 5. 1/15 mol. sekundäres Natriumphosphat (11,876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) in 1 Liter. 6. 0,1 molare Lösung von sekundärem Natriumcitrat. 21,01 g Citronensäure löst man in 200 ccm n-NaOH und füllt mit Wasser auf 1 Liter auf. 7. 0,2 Mol. (12,40 g) Borsäure in 100 ccm n-NaOH gelöst, mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

## a) Glykokoll-Mischungen.

| Glyko-<br>koll-<br>lösung<br>ccm | HCl-<br>Lösung<br>ccm | pH   | Glyko-<br>koll-<br>lösung<br>ccm | HCl-<br>Lösung<br>ccm | pH   | Glyko-<br>koll-<br>lösung<br>ccm | NaOH-<br>Lösung<br>ccm | pH    | Glyko-<br>koll-<br>lösung<br>ccm | NaOH-<br>Lösung<br>ccm | pH    |
|----------------------------------|-----------------------|------|----------------------------------|-----------------------|------|----------------------------------|------------------------|-------|----------------------------------|------------------------|-------|
| 10,00                            | + 0,00                | 6,10 | 6,00                             | + 4,00                | 2,27 | 10,00                            | + 0,00                 | 6,10  | 5,10                             | + 4,90                 | 11,06 |
| 9,90                             | + 0,10                | 4,41 | 5,00                             | + 5,00                | 1,93 | 9,90                             | + 0,10                 | 7,80  | 5,00                             | + 5,00                 | 11,30 |
| 9,75                             | + 0,25                | 3,99 | 4,00                             | + 6,00                | 1,64 | 9,75                             | + 0,25                 | 8,23  | 4,90                             | + 5,10                 | 11,56 |
| 9,50                             | + 0,50                | 3,67 | 3,00                             | + 7,00                | 1,41 | 9,50                             | + 0,50                 | 8,57  | 4,50                             | + 5,50                 | 12,09 |
| 9,00                             | + 1,00                | 3,34 | 2,00                             | + 8,00                | 1,25 | 9,00                             | + 1,00                 | 8,92  | 4,00                             | + 6,00                 | 12,39 |
| 8,00                             | + 2,00                | 2,92 | 1,00                             | + 9,00                | 1,14 | 8,00                             | + 2,00                 | 9,36  | 3,00                             | + 7,00                 | 12,67 |
| 7,00                             | + 3,00                | 2,60 | 0,00                             | + 10,00               | 1,03 | 7,00                             | + 3,00                 | 9,71  | 2,00                             | + 8,00                 | 12,85 |
|                                  |                       |      |                                  |                       |      | 6,00                             | + 4,00                 | 10,14 | 1,00                             | + 9,00                 | 12,97 |
|                                  |                       |      |                                  |                       |      | 5,50                             | + 4,50                 | 10,48 | 0,00                             | + 10,00                | 13,06 |

## b) Phosphat-Mischungen.

| Sekundäre<br>Phosphat-<br>lösung<br>ccm | Primäre<br>Phosphat-<br>lösung<br>ccm | pH   | Sekundäre<br>Phosphat-<br>lösung<br>ccm | Primäre<br>Phosphat-<br>lösung<br>ccm | pH   | Sekundäre<br>Phosphat-<br>lösung<br>ccm | Primäre<br>Phosphat-<br>lösung<br>ccm | pH   |
|---|---------------------------------------|------|---|---------------------------------------|------|---|---------------------------------------|------|
| 10,00                                   | + 0,00                                | 9,18 | 7,00                                    | + 3,00                                | 7,16 | 1,00                                    | + 9,00                                | 5,90 |
| 9,90                                    | + 0,10                                | 8,67 | 6,00                                    | + 4,00                                | 6,97 | 0,50                                    | + 9,50                                | 5,58 |
| 9,75                                    | + 0,25                                | 8,33 | 5,00                                    | + 5,00                                | 6,81 | 0,25                                    | + 9,75                                | 5,28 |
| 9,50                                    | + 0,50                                | 8,04 | 4,00                                    | + 6,00                                | 6,64 | 0,10                                    | + 9,90                                | 4,94 |
| 9,00                                    | + 1,00                                | 7,73 | 3,00                                    | + 7,00                                | 6,46 | 0,00                                    | + 10,00                               | 4,49 |
| 8,00                                    | + 2,00                                | 7,38 | 2,00                                    | + 8,00                                | 6,23 |   |                                       |      |

## c) Citrat-Mischungen.

| Citrat-<br>lösung<br>ccm | HCl-<br>lösung<br>ccm | pH   | Citrat-<br>lösung<br>ccm | HCl-<br>lösung<br>ccm | pH   | Citrat-<br>lösung<br>ccm | NaOH-<br>lösung<br>ccm | pH   | Citrat-<br>lösung<br>ccm | NaOH-<br>lösung<br>ccm | pH       |
|--------------------------|-----------------------|------|--------------------------|-----------------------|------|--------------------------|------------------------|------|--------------------------|------------------------|----------|
| 10,00                    | + 0,00                | 4,95 | 4,75                     | + 5,25                | 3,52 | 10,00                    | + 0,00                 | 4,95 | 5,50                     | + 4,50                 | 6,33     |
| 9,50                     | + 0,50                | 4,88 | 4,50                     | + 5,50                | 3,36 | 9,50                     | + 0,50                 | 5,02 | 5,25                     | + 4,75                 | 6,67     |
| 9,00                     | + 1,00                | 4,83 | 4,00                     | + 6,00                | 2,97 | 9,00                     | + 1,00                 | 5,10 | 5,00                     | + 5,00                 | 9,05 bis |
| 8,00                     | + 2,00                | 4,65 | 3,33                     | + 6,67                | 2,27 | 8,00                     | + 2,00                 | 5,31 |                          |                        | 10,09    |
| 7,00                     | + 3,00                | 4,44 | 3,00                     | + 7,00                | 1,92 | 7,00                     | + 3,00                 | 5,56 | 4,50                     | + 5,50                 | 12,07    |
| 6,00                     | + 4,00                | 4,15 | 2,00                     | + 8,00                | 1,41 | 6,00                     | + 4,00                 | 5,96 | 4,00                     | + 6,00                 | 12,36    |
| 5,50                     | + 4,50                | 3,94 | 1,00                     | + 9,00                | 1,17 |                          |                        |      |                          |                        |          |
| 5,00                     | + 5,00                | 3,69 | 0,00                     | + 10,00               | 1,03 |                          |                        |      |                          |                        |          |

d) Borat-Mischungen<sup>2</sup>.

| Borat-<br>lösung<br>ccm | HCl-<br>lösung<br>ccm | pH   | Borat-<br>lösung<br>ccm | HCl-<br>lösung<br>ccm | pH   | Borat-<br>lösung<br>ccm | NaOH-<br>lösung<br>ccm | pH    |
|-------------------------|-----------------------|------|-------------------------|-----------------------|------|-------------------------|------------------------|-------|
| 10,00                   | + 0,00                | 9,24 | 6,50                    | + 3,50                | 8,50 | 10,00                   | + 0,00                 | 9,24  |
| 9,50                    | + 0,50                | 9,16 | 6,00                    | + 4,00                | 8,29 | 9,00                    | + 1,00                 | 9,36  |
| 9,00                    | + 1,00                | 9,08 | 5,75                    | + 4,25                | 8,13 | 8,00                    | + 2,00                 | 9,50  |
| 8,50                    | + 1,50                | 9,00 | 5,50                    | + 4,50                | 7,93 | 7,00                    | + 3,00                 | 9,67  |
| 8,00                    | + 2,00                | 8,90 | 5,25                    | + 4,75                | 7,26 | 6,00                    | + 4,00                 | 9,97  |
| 7,50                    | + 2,50                | 8,79 | 5,00                    | + 5,00                | 6,54 | 5,00                    | + 5,00                 | 11,07 |
| 7,00                    | + 3,00                | 8,67 | 4,75                    | + 5,25                | 2,37 | 4,00                    | + 6,00                 | 12,37 |

<sup>1</sup> S. P. L. SÖRENSEN: Erg. Physiol. 1912, 12, 393.

<sup>2</sup> Bei Verwendung von Boratmischung ist zu beachten, daß die Borsäure leicht mit organischen Substanzen, welche OH-Gruppen enthalten, komplexe Verbindungen einght.

Tabelle 3. Kalium-biphtalat-Mischungen nach CLARK<sup>1</sup>.

Verwendete Lösungen: 0,1 mol. Kaliumbiphtalatlösung, 0,1 mol. HCl-Lösung und 0,1 mol. NaOH-Lösung; die jeweiligen Gemische werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

| Bi-phtalat-lösung ccm | HCl-Lösung ccm | P <sub>H</sub> | Bi-phtalat-lösung ccm | HCl-Lösung ccm | P <sub>H</sub> | Bi-phtalat-lösung ccm | NaOH-Lösung ccm | P <sub>H</sub> | Bi-phtalat-lösung ccm | NaOH-Lösung ccm | P <sub>H</sub> |
|-----------------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------------|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| 50                    | +46,70         | 2,2            | 50                    | +14,70         | 3,2            | 50                    | + 0,40          | 4,0            | 50                    | +29,95          | 5,2            |
| 50                    | +39,60         | 2,4            | 50                    | + 9,90         | 3,4            | 50                    | + 3,70          | 4,2            | 50                    | +35,45          | 5,4            |
| 50                    | +32,95         | 2,6            | 50                    | + 5,97         | 3,6            | 50                    | + 7,50          | 4,4            | 50                    | +39,85          | 5,6            |
| 50                    | +26,42         | 2,8            | 50                    | + 2,63         | 3,8            | 50                    | +12,15          | 4,6            | 50                    | +43,00          | 5,8            |
| 50                    | +20,32         | 3,0            |                       |                |                | 50                    | +17,70          | 4,8            | 50                    | +45,45          | 6,0            |
|                       |                |                |                       |                |                | 50                    | +23,85          | 5,0            | 50                    | +47,00          | 6,2            |

Tabelle 4. Phosphat-Citronensäure-Mischungen nach McILVAINE<sup>2</sup>.

Verwendete Lösungen: 0,2 mol. sekundäre Natriumphosphatlösung und 0,1 mol. Citronensäurelösung.

| P <sub>H</sub> | Phosphat-lösung ccm | Citronensäure-lösung ccm | P <sub>H</sub> | Phosphat-lösung ccm | Citronensäure-lösung ccm | P <sub>H</sub> | Phosphat-lösung ccm | Citronensäure-lösung ccm | P <sub>H</sub> | Phosphat-lösung ccm | Citronensäure-lösung ccm |
|----------------|---------------------|--------------------------|----------------|---------------------|--------------------------|----------------|---------------------|--------------------------|----------------|---------------------|--------------------------|
| 2,2            | 0,40                | 19,60                    | 3,8            | 7,10                | 12,90                    | 5,4            | 11,15               | 8,85                     | 7,0            | 16,47               | 3,53                     |
| 2,4            | 1,24                | 18,76                    | 4,0            | 7,70                | 12,29                    | 5,6            | 11,60               | 8,40                     | 7,2            | 17,39               | 2,61                     |
| 2,6            | 2,18                | 17,82                    | 4,2            | 8,28                | 11,72                    | 5,8            | 12,09               | 7,91                     | 7,4            | 18,17               | 1,83                     |
| 2,8            | 3,17                | 16,83                    | 4,4            | 8,82                | 11,18                    | 6,0            | 12,63               | 7,37                     | 7,6            | 18,73               | 1,27                     |
| 3,0            | 4,11                | 15,89                    | 4,6            | 9,38                | 10,65                    | 6,2            | 13,22               | 6,78                     | 7,8            | 19,15               | 0,85                     |
| 3,2            | 4,94                | 15,06                    | 4,8            | 9,86                | 10,14                    | 6,4            | 13,85               | 6,15                     | 8,0            | 19,45               | 0,55                     |
| 3,4            | 5,70                | 14,30                    | 5,0            | 10,30               | 9,70                     | 6,6            | 14,55               | 5,45                     |                |                     |                          |
| 3,6            | 6,44                | 13,56                    | 5,2            | 10,72               | 9,28                     | 6,8            | 15,45               | 4,55                     |                |                     |                          |

Tabelle 5. Veronalpuffer nach L. MICHAELIS<sup>3</sup>.

Wenn zu n ccm 0,1 mol. Veronal-Natrium 10-n ccm 0,1 mol. HCl gegeben werden, werden folgende P<sub>H</sub>-Werte erhalten:

| n      | P <sub>H</sub> | n    | P <sub>H</sub> | n    | P <sub>H</sub> | n    | P <sub>H</sub> | n    | P <sub>H</sub> | n      | P <sub>H</sub> |
|--------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|--------|----------------|
| (5,10) | (6,40)         | 5,36 | 7,00           | 6,15 | 7,60           | 7,69 | 8,20           | 9,08 | 8,80           | 9,74   | 9,40           |
| (5,14) | (6,60)         | 5,54 | 7,20           | 6,62 | 7,80           | 8,23 | 8,40           | 9,36 | 9,00           | 9,85   | 9,60           |
| 5,22   | 6,80           | 5,81 | 7,40           | 7,16 | 8,00           | 8,71 | 8,60           | 9,52 | 9,20           | (9,93) | (9,80)         |

Nach K. G. STERN<sup>4</sup> ist Veronalpuffer geeignet zu Enzymstudien.

Tabelle 6. Acetat-Veronalpuffer nach MICHAELIS<sup>5</sup>.

Die Stammlösung ist sowohl in bezug auf Natriumacetat als auch auf Veronalnatrium (1/7 m) 9,714 g Natriumacetat, 3 H<sub>2</sub>O und 14,714 g Veronal-Natrium werden in kohlen-säurefreiem Wasser zu einem Volumen von 500 ccm gelöst. Von dieser Stammlösung werden 5 ccm mit a ccm 0,1 n HCl und (18 — a) ccm H<sub>2</sub>O versetzt.

Die folgende Tabelle gibt die Beziehung von a und P<sub>H</sub>.

| a    | P <sub>H</sub> | a   | P <sub>H</sub> | a  | P <sub>H</sub> | a  | P <sub>H</sub> |
|------|----------------|-----|----------------|----|----------------|----|----------------|
| (0)  | (9,64)         | 3,0 | 7,90           | 7  | 6,12           | 12 | 4,13           |
| 0,25 | 9,16           | 4,0 | 7,66           | 8  | 5,32           | 13 | 3,88           |
| 0,5  | 8,90           | 5,0 | 7,42           | 9  | 4,93           | 14 | 3,62           |
| 0,75 | 8,68           | 5,5 | 7,25           | 10 | 4,66           | 15 | 3,20           |
| 1,0  | 8,55           | 6,0 | 6,99           | 11 | 4,33           | 16 | 2,62           |
| 2,0  | 8,18           | 6,5 | 6,75           |    |                |    |                |

<sup>1</sup> CLARK u. LUBS: Journ. of bacteriol 1917, 2, 1, 109, 191.

<sup>2</sup> McILVAINE: Journ. Biol. Chem. 1921, 49, 183.

<sup>3</sup> L. MICHAELIS: Journ. Biol. Chem. 1930, 87, 33.

<sup>4</sup> K. G. STERN: Biochem. Zeitschr. 1931, 234, 116.

<sup>5</sup> L. MICHAELIS: Biochem. Zeitschr. 1931, 234, 139.

## B. Reinigungsmethoden von Enzymen.

### 1. Dialyse, Elektrodialyse und Adsorption.

Neben dem Ziele, die Enzyme in einem solchen Zustand zu bringen, daß sie der analytischen Untersuchung zugänglich sind, sind vor allem zwei Aufgaben der Enzymreinigung zu nennen:

1. Die Begleitstoffe, welche die Enzymwirkung beeinflussen (Aktivatoren und Hemmungskörper) abzutrennen.

2. Enzyme, wie sie in ihren natürlichen Komplexen vorliegen, voneinander zu trennen.

Diese beiden letzteren Forderungen sind nun in der Tat zu einem großen Teil erfüllt worden, während das zuerst genannte Ziel nicht oder doch nur zu einem geringen Grade erreicht ist. Unter den Methoden, die eine Reinigung von Enzymen gestattet, steht an erster Stelle die Adsorption. Daneben kommen Methoden wie Dialyse und Elektrodialyse, die Anwendung von verschiedenartigen Fällungsmitteln und von fraktionierter Aussalzung in Betracht. Die in vielen Fällen wichtige Isolierung eines Enzyms kann unter Umständen auch durch spezifische Vergiftung der begleitenden Enzyme erreicht werden.

Bei der Dialyse gehen die Enzyme selbst gewöhnlich nicht durch die Membranporen durch, während die Elektrolyte und allenfalls vorhandene niedermolekulare Begleitstoffe ungehindert hindurchtreten. Sehr oft aber tritt bei der Dialyse irreversible Zerstörung des Enzyms ein, so daß die Anwendung dieser Methode nicht möglich ist. Man benutzt zur Dialyse entweder käufliche Diffusionshüllen (z. B. von SCHLEICHER & SCHÜLL), Pergamentpapier oder sog. Fischblasen, oder stellt sich selbst aus Kollodium solche nach dem bekannten Verfahren<sup>1</sup> her. Die Dialysierhülsen sind vor Gebrauch auf Dichtigkeit, am besten mit einer kolloidalen Farbstofflösung, z. B. mit einer 0,05%igen Echtblaulösung<sup>2</sup> zu prüfen.

Bei der Elektrodialyse werden die membrandurchgängigen Ionen von den membranundurchgängigen Kolloiden durch elektrischen Transport getrennt. Noch leichter wie bei der gewöhnlichen Dialyse tritt hier irreversible Enzymzerstörung auf, bedingt durch die oft starke Änderung der Wasserstoffionenkonzentration an den Elektroden. Verwendung von niederen Spannungen verringert diese Gefahr, verlängert aber auch zugleich die Dialysierdauer. Die Spannung des angelegten Gleichstromes beträgt gewöhnlich zwischen 100 und 400 Volt, kann aber noch niedriger sein. Es ist Sorge zu tragen, daß der Salzgehalt der Lösung von vornherein sehr gering ist, da sonst Temperaturerhöhung sowie eine erhebliche  $p_{\text{H}}$ -Verschiebung eintreten kann.

Über die von W. PAULI angegebene Apparatur siehe Originalliteratur<sup>3</sup>. Eine für kleine Flüssigkeitsmengen und kurze Dialysierdauer (1 Stunde) günstige Anordnung gibt A. ТÓTH<sup>4</sup> an. Die Literatur über Elektrodialyse findet man bei DHÉRÉ<sup>5</sup> zusammengestellt.

Über die Anwendung von Fällungsmittel, Enzymvergiftung usw. zur Reinigung und Trennung der Enzyme s. Bd. I, S. 688.

Keine dieser Methoden, so unentbehrlich sie sind, kommt an die Bedeutung und an die vielfache Anwendungsmöglichkeit der Adsorptionsmethoden heran. Die Zahl der Stoffe, welche als Adsorbentien für Enzyme gelten können, ist überaus groß. In der Praxis haben sich vor allem die anorganischen Adsorbentien bewährt, unter ihnen besonders die Metallhydroxyde und Oxyde des Aluminiums und Eisens, ferner Kaolin, Kieselsäure, Bleiphosphat und Tricalciumphosphat; als organische Adsorbentien kommen in Betracht neben Eiweißkörpern, Cholesterin und Tristearin.

<sup>1</sup> Siehe dazu L. MICHAELIS: Praktikum der physikalischen Chemie, S. 92. Berlin 1926.

<sup>2</sup> W. OSTWALD: Kleines Praktikum der Kolloidchemie, S. 24. 1922.

<sup>3</sup> Biochem. Zeitschr. 1924, 152, 355.

<sup>4</sup> A. ТÓTH: Biochem. Zeitschr. 1927, 189, 270.

<sup>5</sup> A. DHÉRÉ: Kolloid-Zeitschr. 1927, 41, 243.

Für den Verlauf der Adsorption ist sowohl das Adsorptionsmittel wie auch die Bedingungen, unter denen die Adsorption vor sich geht, maßgebend. Man wird, um zu einer Entscheidung zu gelangen, welches Adsorbens für den gegebenen Fall das beste ist, eine Reihe verschiedenartiger Adsorptionsmittel zu prüfen haben. Dabei ist darauf zu achten, daß nicht immer dasjenige Adsorbens geeigneter für die Reinigung ist, welches das gesuchte Ferment reichlicher adsorbiert. Entscheidend ist vielmehr die auswählende Wirkung des Adsorbens, das Verhältnis zwischen der Adsorption des Enzyms und der seiner Begleitstoffe oder das gegenseitige Verhältnis der Enzyme im Adsorbat bzw. in der Restlösung bei der Auflösung von Enzymgemischen.

Es ist auch nicht genügend, um das Adsorptionsverhalten eines Enzyms gegenüber verschiedenen Adsorptionsmitteln kennen zu lernen und beschreiben zu können, den Adsorptionswert (vgl. Bd. I, S. 694) bei gleichbleibenden Bedingungen zu bestimmen. Sowohl die Höhe des Adsorptionswertes als auch die selektive Wirkung des Adsorbens ist von der Gegenwart natürlicher Begleitstoffe, von der Natur des Lösungsmittels, von der Enzymkonzentration und besonders von der Wasserstoffionenkonzentration des Adsorptionsmilieus abhängig. Über die allgemeinen Richtlinien der Enzymadsorption und Elution (vgl. Bd. I, S. 689).

Ausführung der Adsorption und Elution: Der Enzymlösung fügt man das möglichst fein verteilte Adsorbens am besten in wäßriger Suspension hinzu und sorgt durch kräftiges Schütteln für eine gleichmäßige Verteilung der Suspension. Das Adsorptionsgleichgewicht stellt sich meist sofort ein. Schon nach wenigen Minuten kann man die Restlösung vom Adsorbat durch kurzes aber kräftiges Zentrifugieren trennen. Die in einen Versuch adsorbierte Menge Enzym ermittelt man meistens durch den Enzymgehalt der Restlösung.

Es gibt zwei Wege, eine Reinigung bzw. eine Trennung von begleitenden Enzymen herbeizuführen: Man wird entweder die Begleitstoffe adsorbieren und in der Restlösung das gereinigte Enzym vorfinden (Beispiel: Darstellung tryptischer Enzyme aus Pankreas, vgl. S. 764), oder aber man hat die Möglichkeit aus dem Adsorbens den adsorbierten Anteil des Enzyms wieder freizulegen, zu „eluiere“ (Beispiel: Darstellung ereptischer Enzyme aus Darmschleimhaut, vgl. S. 761). Die Elution gelingt entweder mit Lösungen von verändertem  $p_H$  oder mit Mitteln, welche das Adsorbens verändern. Im allgemeinen haben sich verdünntes Ammoniak oder verdünnte Essigsäure, insbesondere aber Phosphatmischungen als Elutionsmittel bewährt; letztere wirken zugleich auf das Adsorbens ein unter Bildung von basischen Phosphaten, z. B. des Aluminiums oder des Eisens, und wirken wohl aus diesem Grunde besonders gut.

Vor der Ausführung der Elution wird das Adsorbens ein- bis zweimal gewaschen. Als Waschflüssigkeit verwendet man gewöhnlich etwa 20%iges Glycerinwasser, das durch einige Tropfen Pufferlösung auf das  $p_H$  eingestellt wird, bei dem die Adsorption vorgenommen wurde. Dabei wird das Adsorbens mittels eines Glasstabes in der Waschflüssigkeit gleichmäßig suspendiert und in der Zentrifuge wieder abgetrennt. Hierauf wird in gleicher Weise das gewaschene Adsorbens im Elutionsmittel suspendiert. Die Elution erfordert meist eine meßbare Zeit; man läßt deshalb die Suspension vor der Abtrennung auf der Zentrifuge einige Minuten stehen, wenn eine Zerstörung des Enzyms durch eine extreme Wasserstoffionenkonzentration nicht zu befürchten ist. Zweckmäßig führt man bei empfindlichen Enzymen die Adsorption und Elution unter Eiskühlung aus. Die abgetrennte Elution wird, sofern es nötig ist, mit verdünnter Essigsäure bzw. mit verdünntem Ammoniak neutralisiert. Der eluierbare Enzymanteil wird durch Messung des Enzymgehaltes der Elution bestimmt. Aus dem Enzymgehalt der Adsorptionsrestlösung und der Elution wird die prozentuale Enzymausbeute berechnet.



Eine andere Form der Adsorption besteht darin, daß man den Niederschlag als Adsorbens in der Enzymlösung selbst entstehen läßt. Als Beispiel sei die Invertinadsorption mit Bleiphosphat erwähnt; der adsorbierende Niederschlag wird so erzeugt, daß man zur ammonphosphathaltigen Enzymlösung die äquivalente Menge Bleiacetatlösung zugibt (vgl. S. 738).

## 2. Darstellung von Adsorptionsmitteln.

Im folgenden sind die Vorschriften zur Darstellung der gebräuchlichsten Adsorptionsmittel zusammengestellt, wie sie in der Literatur beschrieben sind. Für den Erfolg einer Adsorption ist der physikalische und chemische Zustand des Adsorptionsmittels von großem Einfluß. Gerade die Metallhydroxyde sind schwer in einer leicht reproduzierbaren Form zu gewinnen. Schon so geringfügige Änderungen in der Darstellungsweise, wie die Änderung in der Temperatur oder Geschwindigkeit der Fällung, führen zu ganz anderen adsorptiven Eigenschaften des Metallhydroxydes. Es ist deshalb auf die genaue Einhaltung der Vorschriften zu achten. Man sei sich auch dessen bewußt, daß jede neue Charge der Darstellung in gewissen Grenzen ein anderes Adsorptionsverhalten wenigstens quantitativer Art zeigen kann, daß daher die Angaben über angewandte Mengen des Adsorptionsmittels nur Richtlinien sein können, von denen unter veränderten Bedingungen abzuweichen sein wird.

### a) Aluminiumhydroxyde.

(Präparate nach WILLSTÄTTER und KRAUT).

**Darstellung des Aluminiumhydroxyds  $\gamma$  von der Zusammensetzung  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .**<sup>1</sup> Die heiße Lösung von 500 g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18 \text{H}_2\text{O}$  in 1 Liter Wasser trägt man in einem Schuß in 6,5 Liter Ammonsulfat-Ammoniakwasser von 60° ein. Dieses Reagens enthält 300 g Ammonsulfat und 420 ccm 20%igen Ammoniak, das ist 77,5 g statt ber. 76,6 g Ammoniak. Dieser kleine Überschuß ist nötig; die Flüssigkeit muß alkalisch bleiben. Während des Fällens und eine weitere Viertelstunde wurde lebhaft gerührt, wobei die Temperatur nicht unter 60° sinken soll. Die Fällung ist anfangs ungemein voluminös und wird erst während des Rührens flockig. Man verdünnt auf 40 Liter und dekantiert, wobei der Niederschlag sich zunächst rasch absetzt.

Um noch vorhandenes oder während des Auswaschens aus Ammonsulfat zurückgebliebenes basisches Aluminiumsulfat vollends zu zerlegen, fügt man zum Waschwasser beim vierten Dekantieren einmal 80 ccm 20%igen Ammoniak hinzu. Nach häufigem Auswaschen (zwischen dem 12. und 20. Mal) wird die Waschflüssigkeit nicht mehr klar. Von da ab dekantiert man noch zweimal, wozu mindestens einige Tage erforderlich sind. Das Präparat  $\gamma$  ist eine etwas plastische Masse.

Von besonderer Wichtigkeit ist es, daß dieses Gel Alterungen unterliegt, die von großem Einfluß auf das Adsorptionsvermögen sind. Das Präparat  $\gamma$  ist erst nach 2—3 Monaten im vollen Besitz seiner Adsorptionstüchtigkeit. Für das Orthohydroxyd C beschreibt WILLSTÄTTER außer der Modifikation  $\gamma$  noch zwei andere Modifikationen  $\alpha$  und  $\beta$ , die sich ineinander umwandeln. Die  $\alpha$ -Verbindung verwandelt sich unter Wasser bei Zimmertemperatur oft in einigen Stunden oder an einem Tag in das Hydroxyd  $\beta$ , das sehr langsam, in etwa 3—4 Monaten in die dritte Modifikation  $\gamma$  übergeht.

**Darstellung der  $\alpha$ -Modifikation**<sup>2</sup>. 100 ccm 10%igen Ammoniak werden in 600 ccm Wasser von 63°, das 22 g Ammoniumsulfat enthält, eingegossen und rasch auf 58° gebracht. Dazu gibt man unter starkem Rühren mit der Turbine auf einmal 150 ccm einer 58° warmen Lösung von 76,7 g Ammoniakalaun, wobei die Temperatur auf 61° steigt. Man läßt sie nicht unter 58° sinken und trennt 10 Minuten nach Beginn der Fällung in einer schnell auslaufenden Zentrifuge den Niederschlag möglichst rasch von der Mutterlauge ab. Er wird 5mal auf der Zentrifuge nachgewaschen, wonach man das Gel in eine Flasche überspült und mit je 1,5 Liter Wasser durchschüttelt. Zum ersten Waschwasser fügt man

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. KRAUT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1923, 56, 1118; 1924, 57, 1089.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. H. KRAUT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1925, 58, 2448.

1,25 g  $\text{NH}_3$  hinzu, zum zweiten doppelt soviel. Beim 6. Zentrifugieren bleibt die Flüssigkeit trüb, der Niederschlag enthält dann nur noch Spuren von Sulfat. Jede Nachbehandlung mit Ammoniak dauert etwa 17 Minuten, die ganze Operation von Beginn der Fällung an bis zum Ende des Waschens  $2\frac{1}{2}$  Stunden.

**Darstellung der  $\beta$ -Modifikation<sup>1</sup>.** Die Umwandlung der  $\alpha$ -Verbindung in  $\beta$  tritt in den Präparaten der beschriebenen Darstellung einige Stunden nach der Ausfällung ein. Das Aussehen des Hydrogels ändert sich bei der Umwandlung; aus einer flockigen Suspension wird eine einzige, kompakte Masse von gelbstichigem, plastischem Gel. Zum Nachweis und zur quantitativen Schätzung des Anteils von  $\beta$  in Gemischen mit  $\alpha$  dient die Erhitzung mit Ammoniak, wonach  $\alpha$  noch den Wassergehalt von gegen 50%,  $\beta$  den Gehalt von 27% besitzt.

**Darstellung von Polyaluminiumhydroxyden.** Von den Orthohydroxyden in Reaktionsverhalten und Zusammensetzung gänzlich verschiedene Tonerdegele erhält man, wenn bei der Fällung von Aluminiumsulfat ein Überschuß von starkem Ammoniak verwendet wird. Es treten nach KRAUT und HUMME<sup>2</sup> Polyhydroxyde auf, deren Wassergehalte unter dem des Trihydrates liegen und deren Bildung auf dem Austritt von Wasser aus mehreren  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Molekülen beruht. Bei der Fällung von Aluminiumsulfat mit einem Überschuß von starkem Ammoniak in der Wärme entsteht Sorte B, die bei längerem Erwärmen mit der Mutterlauge noch mehr Wasser verliert und in die Sorte A übergeht. Die Tonerdesorte B entspricht nach KRAUT dem Dialuminiumhydroxyd  $(\text{OH})_2\text{Al}_2\text{O}_3$ ; sie ist unbeständig und verwandelt sich auch bei gewöhnlicher Temperatur unter Wasser in die stabilere Modifikation eines Trihydrates, die nach den Röntgeninterferenzen als Bayerit anzusprechen ist.

Aluminiumhydroxyd B. 250 g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18 \text{H}_2\text{O}$ , gelöst in 750 ccm Wasser, erwärmt man auf  $48^\circ$  und trägt die Lösung auf einmal unter stärkstem mechanischen Rühren in 2,5 Liter auf  $48^\circ$  erwärmtes Ammoniak von 15 Gew.-% ein. Die Temperatur steigt auf  $50^\circ$  und wird unter fortgesetztem Rühren  $\frac{1}{2}$  Stunde zwischen  $48^\circ$  und  $50^\circ$  gehalten. Die sehr voluminöse Fällung wird während des Digerierens etwas dünner, aber nicht flockig. Man verdünnt die Suspension im Filtrierstutzen auf 12 Liter und wäscht unter möglichst vollständigem Dekantieren häufig mit Wasser. Vor dem 4. Dekantieren wird der Niederschlag zur Zerlegung noch vorhandener Spuren basische Sulfats mit dem gleichen Volumen 15%igen Ammoniaks verrührt und nach 5 Minuten auf 12 Liter mit Wasser aufgefüllt. Am Tage der Fällung muß mindestens noch die 5. Dekantation vorgenommen werden, damit das Präparat nicht über Nacht mit dem starken Ammoniak in Berührung ist. Am 2. Tage wird solange weiter dekantiert, bis das Wasser drei aufeinanderfolgende Male nicht mehr klar geworden ist (im ganzen 12—14mal). Während der letzten Waschungen wird der Niederschlag immer kompakter, so daß am Ende die Waschflüssigkeit von dem ziemlich plastischen Gel vollständig abgießen kann.

Aluminiumhydroxyd A<sup>3</sup>. Man hat die Fällung des Tonerdehydrats bei  $55\text{--}60^\circ$  wie bei Sorte B angegeben, ausgeführt und  $\frac{1}{2}$  Stunde kräftig gerührt. Dann wird die Mischung, die man nicht von der Mutterlauge zu trennen braucht, in einen 5 Liter-Kolben mit eingeschlifftenem Kühler umgefüllt und darin 48 Stunden in gelindem Sieden erhalten; die Flüssigkeit bleibt dabei genügend ammoniakalisch, etwa 10%ig. Danach wird die Suspension im Dekantiertopf auf 12 Liter verdünnt und beim Auswaschen vor dem 4. Dekantieren mit Ammoniak verrührt. Auch hier ist das Auswaschen beendet, wenn die Waschflüssigkeit dreimal nacheinander trüb geblieben und vom plastischen Niederschlag restlos abgossen werden kann.

Von dem Aluminiumhydroxyd C unterscheiden sich die beiden anderen Tonerdesorten A und B durch ihre geringere Löslichkeit. Die B-Präparate werden von 1%iger Salzsäure nur peptisiert und erst von 5—10%iger in der Wärme gelöst, A erst von 37%iger. In der Kälte sind sie überhaupt nicht vollständig in Salzsäure löslich. B löst sich beim Erwärmen noch in 0,1%iger, A erst in 30%iger Natronlauge.

**Darstellung des Metaaluminiumhydroxyds von der Formel  $\text{AlO}(\text{OH})$ <sup>4</sup>.** Werden die Ortho- und die Polyhydroxyde des Aluminiums mit Ammoniak unter rascher Steigerung der Temperatur auf  $250^\circ$  erhitzt, so bildet sich aus den ganz verschiedenen Gelen dasselbe neue, dessen Zusammensetzung mit guter Annäherung der Formel  $\text{AlOOH}$  entspricht. Zur Darstellung erhitzt man Gele des Aluminiumhydroxyds beliebiger Zusammensetzung im Einschlußrohr mit 10%igem Ammoniak unter rascher Steigerung der Temperatur 8 bis 9 Stunden auf  $250^\circ$ . Nach dem Erkalten entfernt man das Ammoniak durch häufiges Dekantieren.

<sup>1</sup> Siehe Fußnote 2, S. 712.

<sup>2</sup> H. KRAUT u. W. HUMME: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1931, 64, 1697.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. H. KRAUT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1924, 57, 1089.

<sup>4</sup> R. WILLSTÄTTER u. KRAUT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1925, 58, 2458.

Weder in der Kälte, noch in der Wärme löst sich das Metahydroxyd in Salzsäure, auch nicht in konzentrierter, oder in 4%iger Natronlauge, während Tonerde A immerhin von heißer Säure, Cy auch von heißer verdünnter Lauge gelöst werden. Das Metaaluminiumhydroxyd entspricht dem Röntgenspektrum nach dem Bauxit, den J. BÖHM<sup>1</sup> auf ähnlichem Wege künstlich hergestellt hat.

### b) Eisenhydroxyd<sup>2</sup>.

Darstellung. 100 g Ferriammoniumalaun, in 200 ccm Wasser gelöst, wurden bei gewöhnlicher Temperatur auf einmal unter lebhaftem Rühren in 800 ccm Ammoniak-Ammoniumsulfatgemisch eingetragen, das 10,8 g Ammoniak mit 27,5 g Ammoniumsulfat enthielt. So entstand eine gleichmäßige rotbraune Fällung, die noch eine halbe Stunde gerührt wurde. Dann füllte man auf 4 Liter auf und dekantierte, wobei sich das Gel anfangs langsam und in hoher Schicht, später rasch und niedrig absetzte. Nach den ersten Dekantierungen war es zweckmäßig, zweimal einige Kubikzentimeter konzentriertes Ammoniak zuzusetzen. Dadurch gelang es, das Gel von einem noch recht beträchtlichen Schwefelsäuregehalt zu befreien. Bei den letzten Malen war das Waschwasser sehr trübe.

Darstellung von Hämatit. Gefälltes Eisenhydroxyd wird im Trockenschrank solange getrocknet, bis es im Achatmörser gepulvert werden kann. Das möglichst fein zerriebene Produkt wird in kleinen Portionen zu 5–10 g in Porzellantiegeln am Gebläse 10 Minuten lang zur Rotglut erhitzt.

### c) Kaolin<sup>3</sup>.

Das am besten von einer Porzellanfabrik bezogene Kaolin, welches sehr gleichmäßig gemahlen, geschlämmt und dann gepreßt ist, kann nach R. WILLSTÄTTER und K. SCHNEIDER in seiner Adsorptionstüchtigkeit durch Behandeln mit Salzsäure sehr verbessert werden.

Darstellung. 500 g Kaolin wurden mit 1,5 Liter reiner Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,18 gut vermischt und erwärmt, zunächst so langsam, daß es 1 Tag bis zum beginnenden Kochen dauerte, dann einen weiteren Tag zum lebhaften Sieden. Durch Verdünnen und wiederholtes Dekantieren mit Wasser trennte man die eisenhaltige Lösung vom Kaolin ab und wiederholte noch dreimal diese Behandlung mit Salzsäure. Schließlich wurde das Kaolin mit kaltem Wasser durch Dekantieren gewaschen.

## II. Hydrolytische Enzyme.

### A. Lipasen und Esterasen.

Die Lipasen spalten Fette und einfache Ester, wie z. B. Tributyrin, Triacetin, Methylbutyrat in ihre Komponenten Alkohol (Glycerin) und Fettsäuren. Eine Einteilung der Lipasen auf Grund ihrer Spezifität ist bis jetzt nicht zweckmäßig. Man unterscheidet die Enzyme besser nach ihrem Vorkommen und teilt sie ein in tierische Esterasen: Magen-, Pankreas-, Leber-, Serum-, Lipase und pflanzliche Esterasen, als deren bestuntersuchter Vertreter die Ricinuslipase zu gelten hat. Die einzelnen Lipasen unterscheiden sich in ihrer Spezifität zwar nicht in qualitativer, sehr stark indes in quantitativer Hinsicht. Das Pankreasenzym hydrolysiert sehr leicht die Glycerinester höherer Fettsäuren, nur trägt die Ester niederer Fettsäuren, während für das Leberenzym das Gegenteil gilt<sup>4</sup>. Auch in bezug auf die stereochemische Spezifität sind erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Lipasen zu bemerken. Die konfigurativ spezifische Einstellung ist bei den Esterasen im allgemeinen weniger streng als bei anderen Enzymgruppen, z. B. den Peptidasen oder Hexosidasen; gewöhnlich werden nämlich die beiden Antipoden, nur mit verschiedener Geschwindigkeit hydrolysiert. Für die praktische Bestimmung der verschiedenen Enzyme wird man zweckmäßig ein solches Substrat wählen, das von dem betreffenden Enzym leicht und vollständig gespalten wird.

<sup>1</sup> J. BÖHM: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1925, **149**, 203.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER, H. KRAUT u. W. FREMERY: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1924, **57**, 1491.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. K. SCHNEIDER: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **133**, 193.

<sup>4</sup> R. WILLSTÄTTER u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **138**, 216.

In ihrer chemischen Wirkungsweise schließen sich den Lipasen andere Esterasen an, die auf die Spaltung besonderer in der Natur vorkommender Ester eingestellt sind. Als besonders wichtig darf die Phosphatase gelten, die aus Phosphorsäureestern von Kohlenhydraten, wie sie z. B. in den Nucleinsäuren vorliegen, oder aus Phosphorsäureestern von Proteinen die Abspaltung von Phosphor bewirkt. Eine weitere Esterase von spezifischer Wirkung ist die Sulfatase, die den Zerfall von Schwefelsäureester z. B. von Phenolen oder Kresolen katalysiert. Die Tannase weiterhin spaltet die Ester der Phenolcarbonsäuren, in denen die alkoholische Komponente Methylalkohol, Phenol oder Hydroxyle der Gallussäure, der Zuckerarten und anderer in der Natur vorkommender Alkoholgruppen sein kann:

### 1. Bestimmungsmethoden der Lipasen.

Die Methoden zur Bestimmung von Lipasen können entweder auf der alkalimetrischen Messung der entbundenen Fettsäure oder auf der Messung der bei der Hydrolyse, z. B. von Butyrinen in wäßriger Lösung sich ändernden Oberflächenspannung beruhen. Der ersteren Methode schließt sich eine gasanalytische Bestimmung nach RONA<sup>1</sup> an, welche in Anlehnung an die WARBURGSche Methode des Glykolyse nachweises (vgl. S. 804) die bei der Verseifung von Estern (Tributyryn) gebildete Säure (Buttersäure) dadurch zu messen gestattet, daß man das Volumen einer durch die Buttersäure aus einer Bicarbonatlösung ausgetriebenen äquivalenten Menge Kohlensäure manometrisch mißt. Die Methode erlaubt sehr geringe Lipasemengen zu bestimmen und das Ferment im lebenden Gewebe nachzuweisen.

#### a) Titrimetrische Methode.

Die titrimetrische Methode zur Bestimmung von Lipasen ist überall da anzuwenden, wo große Enzymkonzentrationen eine große, leicht meßbare Spaltung gewährleisten.

α) Bestimmung der Pankreaslipase durch Titration. Charakteristisch für die Pankreaslipase ist ihre Abhängigkeit von dem kolloiden System, in dem sie zur Wirkung gelangt. R. WILLSTÄTTER und Mitarbeiter<sup>2</sup> haben mehrere Bestimmungsmethoden ausgearbeitet, bei denen diese Eigentümlichkeit der Lipase berücksichtigt ist. Der zufällige und wechselnde Gehalt an aktivierenden und hemmenden Begleitstoffen wird dabei durch Zugabe von Aktivatoren bzw. von Hemmungskörpern im Überschuß ausgeglichen. Von den von WILLSTÄTTER ausgearbeiteten Verfahren findet am häufigsten Anwendung „die alkalimetrische Bestimmung im System von Aktivatoren bei wechselndem  $p_H$ “; sie ermöglicht die quantitative Erfassung des Enzyms auf allen Stufen der Reinigung. Die lipatische Wirkung des in Form der getrockneten und gemahlene Pankreasdrüse oder in Form von Lösungen vorliegenden Enzyms wird an der Spaltung von Olivenöl unter Aktivierung mit Calciumchlorid und Eialbumin bei einem anfänglichen  $p_H$  von 8,9. Die Möglichkeit, die Lipase verschiedener Reinheitsgrade quantitativ zu erfassen, ist durch ausgleichende Aktivierung gegeben. Als Aktivatoren für die Spaltung echter Fette durch pankreatische Lipase wirken bei alkalischer Reaktion Proteine, ferner Gallussalze oder auch Kalkseife, die sich auf Zusatz löslicher Calciumsalze aus der entstehenden Fettsäure bildet. Ihre aktivierende Wirkung beruht auf der Erzeugung von Kolloidteilchen, welche gegenüber dem Enzym wie gegenüber

<sup>1</sup> P. RONA u. A. LASNITZKI: Biochem. Zeitschr. 1924, 152, 504.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 125, 93.

dem Substrat adsorbierend wirken und dadurch deren Reaktion erleichtert. Das System Calcium-Ion + Eialbumin zeichnet sich durch besonders günstige aktivierende Wirkung aus. Eine geeignete Wasserstoffzahl wird mit einem Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer  $p_H = 8,9$  bei  $30^\circ$  eingestellt. Man wendet eine für die entstehende Fettsäure unzureichende Menge Puffer an und verzichtet auf eine Konstanthaltung der Wasserstoffzahl, da die hierfür erforderliche Anwendung einer hohen Konzentration des alkalischen Puffers das Enzym, namentlich in reinerer Form schädigen würde. Die Spaltung wird also eingeleitet bei alkalischer Reaktion ( $p_H = 8,9$ ), die Reaktion eines Analysengemisches bei 8,5% Spaltung ist neutral und sie entspricht bei der maximal zulässigen Verseifung von 24% dem  $p_H = 5,5$ .

Ausführung der Bestimmung. Die Verseifungsproben werden immer in der gleichen Reihenfolge der Komponenten angesetzt, nämlich so, daß man in einer weithalsigen Flasche von 30 ccm Inhalt mit gut eingeschliffenen Glasstopfen das Enzymmaterial mit Wasser

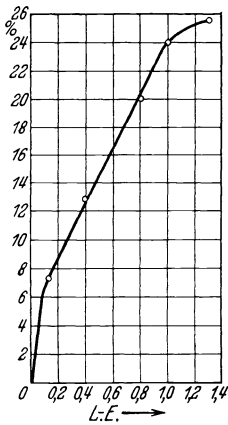


Abb. 1. Lipaseeinheiten und Olivenölspaltung.

Wenn dieses Stadium erreicht ist, nützt Fortsetzung des Schüttelns, etwa im Thermostaten während der ganzen Versuchsdauer nichts mehr. Nach der Reaktionszeit von 60 Minuten, bei einer Spaltung von 10–20% ist eine homogen aussehende Sahne, die alles Öl einschließt, über einer klaren oder milchigen Flüssigkeit abgesetzt. Man beläßt die Probe während dieser Zeit im Thermostaten von  $30^\circ$ . Nach Ablauf der Reaktionszeit wird zur Titration der Flascheninhalt mit 96%igem Alkohol in einem ERLNMEYER-Kolben gespült, so daß das Volumen der alkoholischen Flüssigkeit 125 ccm beträgt. Die Vermischung des Öles mit der Lösung wird durch Zugabe von 20 ccm Äther vervollständigt. In der alkoholisch-ätherischen Lösung wirkt die Lipase nicht weiter. Als Indicator verwendet man 12 Tropfen einer 1%igen alkoholischen Lösung von Thymolphthalein und titriert mit alkoholischer 0,1 n- bis n-Kalilauge bis zu einem deutlich blauen Farbton. Von dem dabei gefundenen Wert ist der Alkaliwert des Puffers, der Enzymlösung, des zugesetzten Proteins, der in einer analog angesetzten Leerprobe zu ermitteln ist, abzuziehen.

Auswertung der Resultate: Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse und der Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge besteht unter den Bedingungen der Methode keine einfache Gesetzmäßigkeit. Daher liegt der Bestimmungsmethode die Beziehung zwischen Enzymmenge und dem Spaltungsgrade zugrunde, der in 60 Min. gefunden wird. Abb. 1 veranschaulicht diese Beziehung.

Bei 24–25% Verseifung wird die Kurve abgeknickt; von diesem Punkt an entspricht großer Zunahme der Enzymmenge nur eine geringe Vermehrung der Spaltung. Die Menge des angewandten Enzyms ist so zu wählen, daß die Hydrolyse zwischen 10 und 24% beträgt; überschreitet die Spaltung 24%, so sollte die Bestimmung mit einer kleineren Enzymmenge wiederholt werden.

Als Maß für die Menge der Lipase dient die Lipase-Einheit, die definiert ist als diejenige Enzymmenge, die unter den angewandten Bedingungen bei 30° in einer Stunde 4% von 2,5 g Olivenöl von der Verseifungszahl 185 spaltet. Das Maß für die Konzentration der Lipase, ihren Reinheitsgrad ist der Lipase-Wert; er bedeutet die Anzahl der Lipaseeinheiten in einem Zentigramm Präparat.

Beispiel. Ein Bestimmungsansatz mit 6,25 mg Pankreasprobe verbrauchte nach einstündiger Hydrolyse, nach Abzug des Verbrauchs der Leerprobe 1,25 ccm n = 70,6 mg KOH. Die prozentige Spaltung von 2,5 g Öl der Verseifungszahl 185 betrug also  $\frac{70,6 \cdot 100}{185 \cdot 2,5} = 15,1$ , welche der Wirkung von 0,52 Lipase-Einheiten entspricht. Der Lipase-wert dieses Drüsenmaterials war mithin  $\frac{0,52}{0,625} = 0,83$ .

β) Bestimmung der Ricinuslipase<sup>1</sup>: Die Lipase wird gemessen durch ihre Wirkung auf Olivenöl bei p<sub>H</sub> = 7,4, 20° und bei einer für alle Bestimmungen gleich gewählten Zeit (20 Min.). Die gebildete Fettsäure wird alkalimetrisch bestimmt.

In ein kleines zylindrisches Standfläschchen von 15–20 ccm Inhalt mit exakt eingeschliffenen Stopfen wird das zu untersuchende Enzymmaterial eingewogen, und zwar in der Regel die 1,0 g rohem, ungeschältem Samen entsprechende Menge, und mit 2,5 g Olivenöl von bekannter Verseifungszahl vermischt. Das Öl wird pipettiert; zweckmäßig eicht man sich eine Meßpipette, indem man auswägt, wieviel Kubikzentimeter Öl 2,5 g entsprechen. Zu der auf 20° gehaltenen Mischung gibt man alsdann 2,00 ccm 0,5 n Acetatpuffer von p<sub>H</sub> = 4,7 und schüttelt das Fläschchen sogleich 3 Minuten kräftig mit der Hand; dann beläßt man es noch 17 Minuten im Thermostaten bei 20°. Das Reaktionsgemisch wird nach Ablauf dieser Zeit mit 30 mm 96%igem Alkohol in einen 250 ccm ERLÉNMEYER-Kolben übergespült und die gebildete Fettsäure nach Zugabe von 15 ccm Äther mit n-KOH und Phenolphthalein als Indicator bestimmt. Der Laugenverbrauch einer Leerbestimmung muß von der Hauptanalyse abgezogen werden. Der Berechnung des prozentualen Umsatzes liegt die Verseifungszahl des angewandten Olivenöls (etwa 185) zugrunde.

Maße für die Ricinuslipase: Als Maß für die Ricinuslipase wählen WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ die Phytolipase-Einheit, d. i. diejenige Enzymmenge, welche unter den Bedingungen der Bestimmung 2,5 g Olivenöl von der Verseifungszahl 185,6 zu 7,5% spaltet. Die Beziehungen der gemessenen Verseifung und der Anzahl der Phytolipase-Einheiten ist durch Abb. 2 wiedergegeben.

Wenn die Spaltung 45% überschreitet, wird die Meßmethode ungenau. Als Maß für die enzymatische Konzentration eines Präparates dient der Phytolipasewert, der bestimmt ist durch die Anzahl der Phytolipase-Einheiten im Kilogramm des Präparates.

### b) Stalagmometrische Methode<sup>2</sup>.

Die stalagmometrische Bestimmung der Lipase beruht auf der Messung der Oberflächenspannungsänderung, die eine Tributyrinlösung bei der Hydrolyse erleidet. Tributyrin und verwandte Ester setzen die Oberflächenspannung einer wäßrigen Lösung stark herab, während ihre Spaltungsprodukte nicht oder

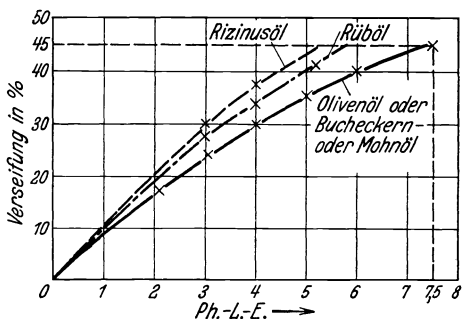


Abb. 2. Phytolipaseeinheiten und Ölspaltung.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 134, 161.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 129, 1.

kaum diese Eigenschaft haben. Die Größe der Oberflächenspannung wird mittels der Tropfmethode gemessen. Auch bei dieser Methode ist im Falle der Pankreaslipase eine ausgleichende Aktivierung durch Calciumoleat und Albumin nötig zur Ausschaltung aktivierender oder hemmender Begleitstoffe. Als geeigneter Puffer wird Ammoniak-Ammonchloridpuffer von  $p_H = 8,6$  gewählt. Als Substrat dienen wäßrige, gesättigte Lösungen von Tributyrin. Da jedoch das Tributyrin des Handels mit Dibutyryn verunreinigt ist, lassen sich aus ihm keine Lösungen von konstanten Eigenschaften gewinnen; es muß zunächst durch Waschen von dem leichter löslichen Diglycerid befreit werden. Elfmaliges längerer Ausschütteln von 50 g käuflichen Tributyrin mit je 400 ccm Wasser ergibt ein für Lipasemessungen meist genügend reines Produkt. Ein Tributyrin ist rein, wenn man aus einer größeren Menge (5–10 g) beim Schütteln mit 200 ccm Wasser eine Lösung von derselben Tropfenzahl bekommt, wie aus drei Tropfen Tributyrin.

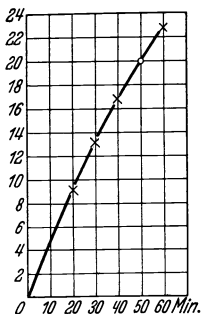


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Tributyrinspaltung durch eine Butyraseeinheit.

Zur Herstellung einer gesättigten Tributyrinlösung schüttelt man 10 Tropfen des gereinigten Tributyrins mit 1 Liter Wasser 1–2 Stunden auf der Schüttelmaschine und läßt 12–24 Stunden stehen; ältere Mischungen sollen nicht angewandt werden. Den ungelösten Teil läßt man absetzen und filtriert durch ein Faltenfilter, bis ein klares Filtrat erreicht ist.

Die Enzymmenge ist so zu wählen, daß sie in den geraden Bereich der Eichungskurve (Abb. 3) fällt; es genügt 1/100 bis 1/500 der zur alkalimetrischen Bestimmung angewandten Lipasemenge.

**a) Bestimmung der Pankreas-Lipase.** Die Bestimmung der Tropfenzahl erfolgt nach der Methode von J. TRAUBE mit einem WO. OSTWALD'schen geraden Stalagmometer<sup>1</sup> oder einer Tropfpipette. Die durch Vorversuche ermittelte geeignete Enzymmenge wird mit der Lösung von 30 mg Eieralbumin mit 0,5 ccm 2%iger Calciumchloridlösung, 56 ccm Tributyrinlösung und dann sofort mit 2 ccm  $n\text{-NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (1 Teil 2,5  $n\text{-NH}_3$  und 8 Teile 2,5  $n\text{-NH}_4\text{Cl}$ ;  $p_H = 8,6$ ) sowie 0,5 ccm 2%iger Lösung von Natriumoleat versetzt, so daß das gesamte Volumen 60 ccm beträgt. Darauf wird sogleich die Anfangstropfenzahl gemessen und bei einer Temperatur von 20° deren Abnahme in Abständen von 20 Minuten etwa 3–4mal bestimmt.

Der Ermittlung der Lipasemenge liegen die Beziehungen zwischen Tropfenabnahme und Reaktionszeit zugrunde. Die Butyrase-Einheit stellt annähernd einen einfachen Bruchteil der mittels Ölspaltung definierten Lipase-Einheit dar, nämlich 0,001 Lipase-Einheiten. In gewissen Grenzen schwankt jedoch das Verhältnis Ölspaltung : Butyrinspaltung je nach dem Enzympräparat. Innerhalb des für die Bestimmung in Betracht kommenden Bereichs von Lipasemengen herrscht Proportionalität zwischen Reaktionszeit und Enzymmenge. Aus ihren Messungen leitet sich die nachstehende Kurve ab; sie stellt die Abnahme der Tropfenzahl in verschiedenen Zeiten durch eine Butyrin-Einheit dar. Die Butyrase-Einheit ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter den angeführten Bedingungen eine Abnahme von 20 Tropfen, das ist etwa die Hälfte der Differenz zwischen der Tropfenzahl von reiner Tributyrinlösung und von reinem Wasser, in 50 Minuten bewirkt. Wenn die analysierte Enzymmenge z. B. in 20 Minuten eine Tropfenabnahme von 4,5, nach 30 Minuten um 6,5 bewirkt hat, so hätte nach der Kurve in Abb. 3 1 Butyrase-Einheit die gleiche Abnahme in 10, bzw. in 15 Minuten herbeigeführt; die gesuchte Lipasemenge ist also  $\frac{10}{20}$  und  $\frac{15}{30} = 0,5$  Butyrase-Einheiten.

**β) Bestimmung der Magenlipase.** Für die nur in geringer Konzentration vorkommende Lipase des Magens eignet sich am besten die empfindliche stalagmometrische Bestimmung der Tributyrinhydrolyse. Es ist jedoch nicht möglich, die für die Pankreaslipase aufgestellte „Butyrin-Einheit“ ohne weiteres der Messung der Magenlipase zugrunde zu legen; es werden nur scheinbare Enzymmengen, wie sie der jeweilige Aktivierungszustand vortäuscht, gemessen. R. WILLSTÄTTER, F. HAUROWITZ und F. MEMMEN<sup>2</sup> bezeichnen diese scheinbare Lipasemenge mit B.-(e.) und definieren sie als die enzymatische Leistung, die eine

<sup>1</sup> WO. OSTWALD: Praktikum der Kolloidchemie, S. 30. Berlin 1923.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER, F. HAUROWITZ u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 140, 203.

gleiche Tropfenabnahme bewirkt, wie die unter bestimmten Bedingungen aufgestellte Pankreaslipase-Einheit. Diese scheinbare Wirkung wird unter dem Einfluß der im Präparat gerade gegebenen, aktivierend und hemmend wirkenden Begleitstoffe und bei einem vorgeschriebenen, aber mit der Tierart wechselnden optimalen  $p_H$ , im übrigen unter den für das Pankreasenzym angegebenen Bedingungen. Das  $p_H$ -Optimum für die Magenlipase des Hundes und Kaninchens ist 6,3, der Katze und des Hasens 5,5, für Ratte, Meerschweinchen und Pferd 7,1—7,9.

γ) **Bestimmung der Leberlipase**<sup>1</sup>. Das Leberenzym wird gemessen durch die stalagmometrische Verfolgung der Tributyrinhydrolyse bei  $p_H = 8,6$  und zwar ohne ausgleichende Aktivierung; das Enzym befindet sich nämlich in einem ausgleichend aktivierten natürlichen System, an dem durch keinerlei Zusatzstoffe Aktivierungserscheinungen beobachtet wurden. Auch durch die bisher vorgenommenen Reinigungsversuche hat es sich nicht verändert. Der Versuchsansatz schließt sich dem für das Pankreasenzym an; nur die aktivierenden Zusätze fallen weg. Entsprechend der Butyrase-Einheit des pankreatischen Enzymes liegt der Einheit für das Leberenzym die Leistung zugrunde, die in dem OSTWALD'schen Stalagmometer mit der Tropfenzahlabnahme um 18 in 50 Minuten bei 30° gemessen wird.

Die Reinheitsgrade werden durch den Leberbutyrasewert ausgedrückt, nämlich durch die Anzahl Leberbutyrase-Einheiten in 1 g Trockensubstanz.

### c) Gasanalytische Bestimmung von Lipasen im WARBURG-Apparat.

Diese Methode von P. RONA und A. LASNITZKY<sup>2</sup> beschrieben, gestattet Lipase in sehr geringer Konzentration wie sie z. B. in Geweben, Organen und Organflüssigkeiten vorkommen zu messen. Das Prinzip besteht darin, daß die bei der Tributyrinspaltung freiwerdende Buttersäure gemessen wird durch die äquivalente Menge Kohlensäure, die aus einer Bicarbonatlösung freigemacht und gasvolumetrisch bestimmt wird; die Methode schließt sich der Bestimmung der Glykolyse nach O. WARBURG an und erlaubt eine besondere Genauigkeit für die Messung geringer Enzymkonzentrationen. Zur Messung der Kohlensäuredienen BARCROFT'sche Blutgasmanometer, die auf einer Schüttelvorrichtung montiert sind. Über die Apparatur (Wasserthermostat, Manometer, Schüttelvorrichtung und Trog) sowie über die Ermittlung der Gefäßkonstanten vergleiche den Abschnitt über Glykolyse (S. 804).

**Ausführung der Bestimmung.** Der Trog (Abb. 21—23) wird mit 2,5 ccm Serumverdünnung oder bei Versuchen mit Geweben mit der gleichen Menge Ringerlösung beschickt. Die Schnitte werden an einer Glasnadel befestigt. In die Retorte kommen 0,3 ccm einer Tributyrinemulsion, die 1 ccm Tributyrin auf 100 ccm Ringerlösung enthält. Die hier verwendete Ringerlösung zur Glykolyse nach WARBURG ist folgendermaßen zusammengesetzt: 100 ccm 9‰ NaCl + 2 ccm 1,2% KCl + 2 ccm 1,76% CaCl<sub>2</sub> (kryst.) + 20 ccm 1,26% NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Nachdem der Helm des BARCROFT-Manometers mit dem Troge verbunden und die gefüllte Retorte eingesetzt ist, wird unter Schütteln ein Gemisch von 5 Vol.-% Kohlensäure und 95 Vol.-% Stickstoff<sup>3</sup> eingeleitet. Das Gasgemisch tritt an dem mit Hahn versehenen rechten Schenkel des Manometers ein und am Tubus des Helms wieder aus. In der Retorte eines Kontrolltroges kommen 0,3 ccm Ringerlösung. Nun werden die Apparate ins Wasserbad gesetzt und zwecks Temperatenausgleich 10 Minuten lang geschüttelt. Die Bewegung hat bei nicht zu großer Amplitude etwa eine Frequenz von 100—120 je Minute. Unmittelbar nach dem Eintauchen der Gefäße in das Wasserbad dehnt sich das Gas aus und drückt den rechten Barometerschenkel nach unten. Man kann diese anfängliche Druckzunahme ausgleichen, indem man — bei dem nötigen Überdruck in dem rechten Schenkel — ganz kurz den Hahn öffnet, wobei etwas Gas entweicht, Luft aber nicht eindringen kann. Bleibt das Thermobarometer konstant, so ist der Temperaturausgleich beendet und die Ablesungen können beginnen. Man dreht die Retorte nach oben um, die Tributyrinemulsion fließt in den Trog und die Spaltung setzt ein. Die Einstellung auf die Nullmarke und die Ablesung des Manometerstandes wird sofort im Anschluß daran vorgenommen. Die im Kontrolltrog (Leerversuch) vor sich gehenden Prozesse beschränken sich bei Anschluß der Atmung wohl vorwiegend auf autolytische Vorgänge. Die hierbei auftretenden Säuren treiben aus dem Bicarbonat der Ringerlösung eine äquivalente, meist kleine Kohlensäuremenge aus. Dieser Wert muß noch von dem berechneten Versuchswert

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 216.

<sup>2</sup> P. RONA u. A. LASNITZKY: Biochem. Zeitschr. 1924, 152, 504.

<sup>3</sup> Die Zusammensetzung des Gasgemisches wird vorher ermittelt.



abgezogen werden, multipliziert mit der Gefäßkonstante des entsprechenden Gefäßes (Korrektur in ccm). Sind die Druckdifferenzen nur auf Temperatur und Luftdruckschwankungen zurückzuführen (Kontrollgefäß als Thermobarometer), so wird einfach der abgelesene Höhenunterschied subtrahiert (Korrektur in mm).

Aus der durch die Tributyrinspaltung freigewordenen Kohlensäure (ccm) erhält man die gebildete Buttersäure in Mikromolen durch Division mit 22,4. Diese Werte gelten im allgemeinen als Maß der Tributyrinspaltung. Für Gewebsschnitte werden alle Werte auf 1 mg Trockensubstanz bezogen.

## 2. Gewinnung und Reinigung von Lipasen.

### a) Tierische Lipasen.

**α) Pankreaslipase<sup>1</sup>.** Als Ausgangsmaterial dient die mit Aceton und Äther getrocknete und entfettete Pankreasdrüse, deren Aktivität bei der Trocknung keine wesentliche Einbuße erleidet. Zur Darstellung möglichst kräftiger Enzympräparate empfiehlt es sich, die Pankreasdrüse von Schweinen zu verwenden, da sie die lipatisch wirksamste ist. Das getrocknete Material extrahiert man mit Glycerin, welches wäßrigen Lösungsmitteln überlegen ist; in der Glycerinlösung ist die Lipase nämlich reiner und beständiger.

Vom Schlachthof frisch bezogene Drüsen werden von Fett und Gewebe möglichst befreit und mit der Fleischmaschine zerkleinert. Der Drüsenbrei wird hierauf in weithalsigen Flaschen mit dem doppelten Volumen Aceton verrührt und gut durchgeschüttelt. Nach 1—2stündigem Stehen wird filtriert, um den Filtrerrückstand von neuem durch Schütteln in den Flaschen und Filtrieren wie zuvor mit dem gleichen Volumen Aceton, darauf mit einem Gemisch von Aceton und Äther und schließlich zweimal mit Äther zu waschen. Das körnige und pulverige Material wird zwischen den Fingern zerrieben, in dünner Schicht auf Filtrierpapier ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Das getrocknete Material wird in einer Schlagmühle aufs feinste gemahlen und durch ein feinmaschiges Sieb geschüttelt.

Zur Gewinnung eines Pankreasglycerinauszuges wird das Drüsenmaterial (z. B. 100 g) mit dem 10fachen Volumen (1000 ccm) 87%igen Glycerins gut verrührt. Das Filtrieren eines solchen Glycerinextraktes ist zuweilen etwas langwierig; man verwendet zweckmäßig Faltenfilter Schleicher & Schüll Nr. 1117<sup>1/2</sup>. Die lipatische Wirkung eines solchen Pankreasglycerinextraktes ist unbeschränkt haltbar. Die Lipaseausbeuten betragen in den Glycerinextrakten in der Regel 80—90% des Rohmaterials.

Sowohl die alkalimetrische als auch die stalagmometrische Methode eignen sich zur Messung der Pankreaslipase. Beide Methoden sind früher (S. 715—719) eingehend geschildert worden.

**Reinigung der Pankreaslipase:** Die Abtrennung der Lipase von einer großen Anzahl von Begleitstoffen und den wichtigsten anderen Enzymen der Pankreasdrüse, der Amylase und des tryptischen Enzymkomplexes erfolgt mittels der Adsorptionsmethode. Durch aufeinanderfolgende Adsorption mit Tonerde und Kaolin gelingt es, die enzymatische Konzentration auf etwa das 200fache von der der Drüse zu steigern. Solche gereinigte Präparate zeigen keine Farb- und Fällungsreaktionen von Eiweiß und seinen Abbauprodukten, nur eine schwache Ninhydrinreaktion wurde noch beobachtet.

Über den Gang der Adsorption vgl. WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>1</sup>.

**β) Magenlipase<sup>2</sup>.** Darstellung der Magenlipase. Magen von Hund oder Schwein werden kurz nach dem Schlachten herausgenommen, mit einem scharfen Wasserstrahl gereinigt; darauf wird nach Entfernung des Oesophagus und des Pylorusteiles die Magenschleimhaut von der Muskulatur und Tunica propria abgetrennt. Die Schleimhaut wird in der Fleischmaschine zerkleinert und mit Aceton und Äther (vgl. Trocknung der Pankreasdrüse siehe oben) getrocknet. Das getrocknete Material wird fein gemahlen. Der Kardiateil der Schleimhaut vom Schwein ist viel reicher an Lipase als der Fundusteil; beim Hunde ist eine Teilung in Kardia, Fundus und Pylorus ohne Vorteil. Das so erhaltene Pulver wird etwa 2 Stunden mit der 50fachen Menge 0,025 n-Ammoniak behandelt; Extraktion mit Wasser oder Glycerin führt zu mäßiger Ausbeute. Hierauf wird abzentrifugiert und mittels Essigsäureacetatpuffers ( $p_H = 4,7$ ) eine schwach saure Reaktion hergestellt. Um

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 125, 132.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 133, 247.

konzentriertere Lipaselösungen zu erhalten wird nach Zugabe von 2% Glycerin im Hochvakuum bei 15° zur Sirupdicke eingedampft. Die so gewonnenen Glycerinlösungen sind haltbar, ihr Lipasegehalt ist 40—600mal geringer als der von rohen Glycerinauszügen aus Trockenpankreas.

Zur Reinigung der Magenlipase diente ihre Ausfällung mit verdünnter Essigsäure, die Elektrolyse der in Alkohol gelösten Fällung, sowie eine Voradsorption mit Kaolin in neutraler Lösung, nach der sich für das in der Mutterlauge verbliebene Enzym noch eine charakteristische Steigerung ergab. Bei diesen Reinigungsvornahmen trat eine scheinbare Zunahme an enzymatischer Aktivität auf; die Ausbeute betrug 130% des Ausgangsmaterials. Berücksichtigt man die bei der präparativen Reinigung unvermeidlichen Verluste, so ergibt sich eine Steigerung der enzymatischen Aktivität auf ein vielfaches, die auf die Abtrennung von Hemmungskörpern im Laufe der Reinigung zurückzuführen ist.

Zur Gewinnung und Bestimmung der Darmlipase, für die bisher keine exakten Verfahren vorliegen, wird man ähnlich wie bei der Magenlipase vorgehen haben. A. HAMSİK<sup>1</sup> beschreibt die Gewinnung eines wirksamen und haltbaren Präparates durch Trocknung der Darmschleimhaut vom Schwein mit organischen Solvenzien.

γ) **Leberlipase.** R. WILLSTÄTTER und F. MEMMEN<sup>2</sup> verwenden als Ausgangsmaterial die nach dem bei der Pankreaslipase beschriebenen Verfahren (S. 720) mit Aceton und Äther getrocknete und entfettete Leber, die in staubfeingemahlenem Zustand zur Anwendung gelangt. Das Enzym löst sich daraus in Glycerin, besser noch in der 40fachen Menge 0,025 n-Ammoniak.

Reinigung der Leberlipase. H. KRAUT und H. RUBENBAUER<sup>3</sup> gelang es, das Leberenzym auf etwa den 120fachen Reinheitsgrad zu bringen. Solche Präparate zeigen keine Reaktionen auf bekannte organische Substanzen. Das Enzym ist aber in diesem Zustand äußerst schlecht haltbar. Die ammoniakalischen Auszüge werden einer Dialyse, am besten in Fischblasen, gegen fließendes, destilliertes Wasser unterworfen. Die Dialyse dauert 3 Tage und liefert Ausbeuten von 70—80% des Enzyms. Der dabei auftretende Niederschlag wird abfiltriert. Der Enzymwert des Lebertrockenpulvers ist 0,9—1,3, der des ammoniakalischen Auszuges 2,5—3,8, nach der Dialyse 5—15. Eine Fällung mit Ammonacetat, eine Voradsorption mit Kaolin und Tonerde A, Einengen im Hochvakuum, Adsorption an Kaolin und Elution aus dem Kaolinadsorbat mit darauf anschließender Tonerdeadsorption steigern den Enzymwert der Lösung bis zu 120—130. Für die genaue Vorschrift des Reinigungsganges sei auf die Originalarbeit verwiesen.

δ) **Lipasen des Serums, der Gewebe und Organe.** Lipase findet sich im Blutserum und wohl in den meisten Geweben; nur im Muskel scheint sie zu fehlen. Ihre Wirkung auf echte Fette tritt gegenüber der Spaltung einfacher Ester zurück. Zweckmäßig werden sie wegen ihrer geringen Konzentration mittels der gasanalytischen Methode nach RONA (S. 719) gemessen.

Die Serumlipase<sup>4</sup> wird bei fraktionierter Ausfällung der Globuline bei 4/10—6/10 Ammonsulfatsättigung mit der Globulinfraktion mitgerissen und kann mit diesen Fraktionen mit Glycerin in Lösung gebracht werden. Die Globulinniederschläge werden durch Zentrifugieren von der darüberstehenden Flüssigkeit möglichst gründlich befreit und dann in Glycerin aufgenommen (für 30—40 ccm Serum 5—10 ccm Glycerin).

ε) **Milchlipase:** Die Milchlipase zeigt große Ähnlichkeit in ihrem p<sub>H</sub>-Optimum und in ihrer spezifischen Wirkung auf Fette und niedere Fettsäureester mit der Blutlipase. Nach H. DAVIDSOHN<sup>5</sup> findet sich das Ferment in reichlicheren Mengen nur in der Frauenmilch und fehlt z. B. in der Kuhmilch fast vollständig. Zur quantitativen Bestimmung des Ferments verwendet DAVIDSOHN die stalagmometrische Messung der Tributyrinhydrolyse ohne aktivierende Zusätze. Beispiel eines Versuchsansatzes: 60 ccm Tributyrinlösung, 1 ccm rohe Milch, 3 ccm 1/3 n-Dinatriumphosphat. Bei konstanter Temperatur wird in einem Zwischenraum von 30 Min. die Tropfenzahl mehrmals bestimmt.

## b) Pflanzliche Lipasen.

α) **Lipasen der Samen:** Lipasen sind in den Pflanzensamen weit verbreitet; lipolytisch am stärksten wirksam sind die Samen von *Ricinus communis*

<sup>1</sup> A. HAMSİK: Zeitschr. physiol. Chem. 1909, 59, 1.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. F. MEMMEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 216.

<sup>3</sup> H. KRAUT u. H. RUBENBAUER: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 173, 102.

<sup>4</sup> P. RONA u. PETOW: Biochem. Zeitschr. 1924, 146, 144.

<sup>5</sup> H. DAVIDSOHN: Zeitschr. Kind. 1913, 8, 14.

und von *Chelidonium majus*. Untersucht ist vor allem die Ricinuslipase<sup>1</sup>. Sie ist ausgezeichnet durch ihre vollkommene Unlöslichkeit in wäßrigen Mitteln und unterscheidet sich dadurch von den meisten anderen esterspaltenden Enzymen der Tier- und Pflanzenwelt. Die Ricinuslipase besitzt starke Aktivität nur gegenüber eigentlichen Fetten, während sie niedere Ester verhältnismäßig träge spaltet. Das Enzym hat sein Wirkungsoptimum bei saurer Reaktion, nämlich bei der Wasserstoffzahl von 4,7–5,0; bei der Keimung verschiebt sich der Reaktionsbereich nach der alkalischen Seite hin. Seine Leistung wird durch Aktivatoren nicht beeinflußt.

Darstellung der Ricinuslipase. Da die Ricinuslipase in fettfreier Form außerordentlich empfindlich gegen wäßrige Reagenzien ist, muß man sie bei deren Einwirkung in Berührung mit dem Öl des Samens lassen. Man bereitet nach WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>1</sup> durch Anteigen der Samen mit Wasser in der Reibschale eine Samenmilch, von der eine Sahne, die 90% des Enzyms enthält, durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Die geschälten Ricinusbohnen werden in der Reibschale zu einer zähen Paste verrieben und allmählich unter ständigem Reiben mit der siebenfachen Menge Wasser in kleinen Portionen von 5–10 ccm vermischt. Die gebildete Aufschwemmung wird 15 Minuten lang kräftig zentrifugiert. Dabei bilden sich drei Schichten, von denen die obere, die Sahne, abgeschöpft wird. Der Bodensatz, der noch einen Teil der Sahne enthält, wird derselben Behandlung noch einmal unterworfen. Die so gewonnene Sahne eignet sich für Enzymuntersuchungen.

Die außerordentliche Empfindlichkeit der Ricinuslipase gestaltet die Trocknung, sowie eine weitere Reinigung ohne Aktivitätsverlust, zu einer schwierigen Aufgabe. Die Sahne wird am besten im FAUST-HEIMschen Apparat in dünner Schicht mittels eines warmen Luftstromes auf  $\frac{2}{3}$  ihres Volumens eingedampft. Es hinterbleibt eine ölige Flüssigkeit, die fast die ganze in den Bohnen enthaltene Enzymmenge enthält. Man kann durch eine sehr schonende Ätherbehandlung des so vorgereinigten Enzympräparates noch die enzymatische Konzentration ohne erhebliche Verluste an Enzym steigern, indem man es unter einer geräumigen Glasglocke 36 Stunden in einer Ätheratmosphäre beläßt, dann mit 100 ccm Äther verdünnt und abschleudert. Das abgeschleuderte Enzym wird im Zentrifugenglas noch dreimal mit 30 ccm Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

**β) Lipasen der Pilze und Bakterien.** Von den Pilzlipasen ist die des *Aspergillus oryzae* eingehend untersucht<sup>2</sup>. Das Takaenzym ist eine Esterase, die nur in geringem Maße befähigt ist, Neutralfette zu spalten. Als Substrat dient demgemäß Tributyrin, dessen Hydrolyse nach der stalagmometrischen Methode gemessen wird. Die optimale Wasserstoffzahl ist 8,5–9,0. Eine quantitative Bestimmungsmethode, für die ausgleichende Aktivierung gefordert werden müßte, ist nicht ausgearbeitet; es werden scheinbare Enzymmengen gemessen, d. h. die Ergebnisse der Enzymbestimmungen sind abhängig von dem jeweiligen Aktivierungszustand der Enzympräparate. Der Versuchsansatz nach WILLSTÄTTER und KUMAGAWA ist folgender: 56 ccm gesättigte Tributyrinlösung, 2 ccm 2%ige Ammoniak-Ammoniumchloridlösung,  $p_H = 8,6$ . Die Messung erfolgt im Stalagmometer nach den üblichen Bedingungen (S. 719).

Auch Bakterienlipase<sup>3</sup> wird mit Tributyrin stalagmometrisch bestimmt. Das  $p_H$ -Optimum ist ziemlich breit (zwischen  $p_H = 7,2$  und 9,0). Die Substratlösung wird in der Weise dargestellt, daß Phosphatgemisch nach SÖRENSEN von  $p_H = 7$  mit 4 Teilen Wasser und einigen Tropfen Tributyrin versetzt, 10 Min. geschüttelt und dann filtriert wird. Als Enzymmaterial dient eine Aufschlammung von Bakterien in demselben Phosphatgemisch. Der Versuchsansatz, bestehend aus 8 ccm Tributyrinlösung und 2 ccm Bakterienaufschlammung wird in den Brutschrank gestellt und in bestimmten Zeitabständen nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur die Tropfenzahl bestimmt.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 134, 161.

<sup>2</sup> J. OGAWA: Biochem. Zeitschr. 1924, 149, 216; R. WILLSTÄTTER u. H. KUMAGAWA: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 146, 151.

<sup>3</sup> L. MICHAELIS u. Y. NAKAHARA: Zeitschr. Imm. 1923, 36, 449.

### 3. Andere Esterasen.

#### a) Phosphatase.

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von organischen Phosphorsäureestern, z. B. von Phosphorsäureester des Glycerins, der Zucker und Proteine; auch die Abspaltung von Phosphorsäure aus Nucleinsäuren (vgl. S. 779) ist auf eine Phosphatase zurückzuführen. Ob die Wirkung auf die einzelnen Phosphorsäureester verschiedenen Enzymen zuzuschreiben ist, ist bis jetzt nicht festgestellt, wenn man auch von einer Glycerophosphatase, die den Zerfall des Glycerophosphorsäureesters katalysiert, und von einer Saccharophosphatase, die den Saccharophosphorsäureester spaltet, spricht. Phosphatasen kommen in sehr zahlreichen Pflanzen und Pflanzenteilen sowie in fast allen tierischen Organen in wechselnder Menge vor. Sie spielen eine bedeutende physiologische Rolle im Auf- und Abbau der Hexosephosphorsäureester, welchen als Zwischenprodukten bei der alkoholischen Gärung wie beim Kohlenhydratstoffwechsel im arbeitenden Muskel eine große Bedeutung zukommt. Die Unterscheidung eines besonders synthetisierenden Enzyms von einem nur hydrolysierenden Enzym ist nicht sichergestellt<sup>1</sup>; neuere Arbeiten von J. BODNÁR und B. TANKÓ scheinen dafür zu sprechen<sup>2</sup>.

Die Messung der Phosphatasen beruht meist auf der Bestimmung der bei der fermentativen Spaltung gebildeten anorganischen Phosphorsäure. Einen charakteristischen qualitativen Nachweis geben DJENAB und NEUBERG<sup>3</sup>, ferner J. NOGUCHI<sup>4</sup> an. Verwendet man nämlich als Substrat das leichtlösliche Calcium- oder Bariumsalz der Saccharosephosphorsäure, so bemerkt man nach einiger Zeit, daß die in Freiheit gesetzte Phosphorsäure als eine starre Gallertmasse von Calciumphosphat abgeschieden wird. Quantitativ kann die abgespaltene Phosphorsäure gravimetrisch auf direktem Wege bestimmt werden. Für die exakte Bestimmung der Phosphorsäure ist eine Enteiweißung notwendig, die man entweder erreicht durch bloßes Aufkochen oder besser durch Zugabe von Natriumchlorid und einigen Tropfen Essigsäure und nachherigem Aufkochen oder durch Zusatz von Trichloressigsäure und Filtrieren.

Eine einfache und gute Mikromethode zur Bestimmung des Phosphors gibt H. LIEB<sup>5</sup> an; eine Abänderung dieser Methode stammt von R. KUHN<sup>6</sup>. Angewandt wird auch die Bestimmung der Phosphorsäure nach G. EMBDEN<sup>7</sup> mittels Strychninmolybdatfällung. Bequem läßt sich die Bestimmung des anorganischen Phosphors nach dem Verfahren von B. SCHMITZ<sup>8</sup> vornehmen als Magnesiumpyrophosphat, wenn es sich nicht um allzu geringe Phosphatmengen handelt.

Als besonders enzymreich gelten Hefe, Takadiastasepräparate und Niere. Messung der Nieren-Glycerophosphatase nach H. ERDTMAN<sup>9</sup>. Die Geschwindigkeit mit der Phosphatase aus Niere Glycerophosphat spaltet, folgt nicht ganz dem monomolekularen Zeitgesetz. Als Ausdruck der Phosphataseaktivität wurde deshalb von H. ERDTMAN folgende Gleichung benutzt:

$$\text{Phos.} - f = \frac{10}{T \cdot g \cdot \text{Enzym}}$$

<sup>1</sup> H. v. EULER u. S. KULLBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1911, **74**, 15; **76**, 468; H. v. EULER u. Y. FUNKE: Zeitschr. physiol. Chem. 1912; **77**, 488; **79**, 375; H. P. BARENDRECHT: Biochem. Zeitschr. 1921, **118**, 245.

<sup>2</sup> J. BODNÁR u. B. TANKÓ: Biochem. Zeitschr. 1931, **230**, 230.

<sup>3</sup> K. DJENAB u. C. NEUBERG: Biochem. Zeitschr. 1917, **82**, 391.

<sup>4</sup> J. NOGUCHI: Biochem. Zeitschr. 1923, **143**, 190.

<sup>5</sup> Vgl. ABDERHALDEN: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Teil 3, S. 384.

<sup>6</sup> R. KUHN: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, **129**, 64.

<sup>7</sup> G. EMBDEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, **113**, 138.

<sup>8</sup> B. SCHMITZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1906, **45**, 512.

<sup>9</sup> H. ERDTMAN: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, **172**, 182.

wo  $T$  die Zeit in Stunden ist, in der das Enzym Phosphorsäure entsprechend 30 mg Pyrophosphat in der Reaktionslösung freimacht.

ERDTMAN benutzt als Reaktionslösung folgenden Ansatz: 15 ccm 0,2 m-Natrium-Glycerophosphat, 10 ccm SÖRENSEN-Boratpuffer, 4 ccm Enzym und 20 —  $x$  Wasser;  $p_H$  der Versuchslösung 8,8—9,0; Temperatur 30°. Einwirkungsdauer beträgt 1—6 Stunden.

Gewinnung von Enzympräparaten aus Niere. 1 kg Schweineniere wird gemahlen, mit 1 Liter Wasser und reichlich Toluol gemischt, wonach die Masse bei 30—40° während 24—48 Stunden autolysiert wird. Dann wird gesiebt und die trübe Flüssigkeit mit der doppelten Menge Alkohol gefällt und abzentrifugiert. Die Fällung wird mit Alkohol verrührt und filtriert, diese letzte Operation 2—3mal durchgeführt, wonach man das Pulver mit 0,5 Liter Äther wäscht und in dünnen Schichten ausgebreitet, über eine Nacht bei Zimmertemperatur trocknet. Ausbeute rund 25 g. Es wird dann im Vakuum aufbewahrt. Auch durch Glycerinextraktion können starke Trockenpräparate dargestellt werden.

20 g Trockenpräparat werden mit 200 ccm Wasser und 1 ccm konzentriertem Ammoniak und Glasperlen 2 Tage auf der Maschine geschüttelt; hierauf wird filtriert. Trockengewicht der Lösung je Kubikzentimeter 0,0177 g. 5 ccm Enzym ergeben in 1 Stunde 34,1 mg Pyrophosphat.

Die Nierenphosphatase kann durch Dialyse inaktiviert werden, durch Zusatz des Dialysats aber wieder ihre alte Wirksamkeit zurückgewinnen. Die Aktivitätssteigerung beruht auf der Wirkung von Magnesium-Ionen<sup>1</sup>. Bei der Bestimmung der Phosphatasen ist auf diese Erscheinung Rücksicht zu nehmen und mit Magnesiumsulfat überschüssig zu aktivieren.

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration wechselt je nach Herkunft des Enzymmaterials. Für das Enzym der Takadiastase ist das optimale  $p_H = 5,5$ , aber nach Entfernung eines Begleitstoffes durch Kaolinadsorption und Elution bei  $p_H = 7$  wirkt das Enzym optimal bei  $p_H = 4$ . Nach DEMUTH<sup>2</sup> liegen die Optima der Hexosephosphatase für Muskel bei  $p_H = 7,4$ , für Galle bei  $p_H = 7,8$ , für Speichel bei  $p_H = 7,2$ , für Urin bei  $p_H = 5$ , für Serum bei  $p_H = 6,8 - 7,8$ .

C. NEUBERG<sup>3</sup> gibt Beispiele für Phosphataseansätze.

### b) Sulfatase.

Die Sulfatase katalysiert den Zerfall der Schwefelsäureester, besonders von Phenolen, die der tierische Organismus zur Entgiftung und Ausscheidung eingeführter Phenole abbaut. Sie findet sich nach NEUBERG und Mitarbeitern<sup>4</sup> in Schimmelpilzen wie *Aspergillus oryzae* (Takadiastase) sowie in tierischen Organen, besonders reichlich in Niere, Leber und Muskel.

Als Substrat dient phenolschwefelsaures Kalium oder p-Kresol-schwefelsaures Kalium. Als Fermentpräparate verwendet man sowohl Frischpräparate aus zerkleinerten Organen, als auch Aceton-Äther-Trockenpräparate. Zur Neutralisation und zum Abfangen der entstehenden Schwefelsäure dient Calciumcarbonat als Bodenkörper. Es wird nicht das entsprechende Sulfat bestimmt, sondern der unzerlegt gebliebene Anteil des Substrates. Die abgespaltene Schwefelsäure fällt zum Teil als Gips aus, während die Calciumsalze der unzerlegten Esterschwefelsäuren in Lösung verbleiben.

### c) Tannase.

Die Tannase ist als eine spezifische Esterase zu betrachten, die mit einer besonderen Affinität zu den Estern von Phenolcarbonsäuren ausgestattet ist. Die natürlichen Gerbsäuren, deren strukturelle Eigentümlichkeit in einer ester-

<sup>1</sup> H. ERDTMAN: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 177, 210.

<sup>2</sup> F. DEMUTH: Biochem. Zeitschr. 1925, 159, 415; 166, 162.

<sup>3</sup> C. NEUBERG u. E. SIMON: Methodik der Fermente, herausgeg. von C. OPPENHEIMER u. A. PINCUSSEN. Leipzig 1928.

<sup>4</sup> C. NEUBERG u. KURONO: Biochem. Zeitschr. 1923, 140, 295. — C. NEUBERG u. K. LINHARDT: Biochem. Zeitschr. 1923, 142, 191. — J. NOGUCHI: Biochem. Zeitschr. 1923, 143, 186; 1924, 144, 138. — C. NEUBERG u. E. SIMON: Biochem. Zeitschr. 1925, 156, 365.

artigen Verkettung von Phenolcarbonsäuren untereinander besteht, aber auch Ester der Phenolcarbonsäure mit anderen alkoholischen Komponenten gelten für das Enzym als Substrat. So wird der Gallussäuremethylester sehr leicht gespalten.

Tannasewirkung üben *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* aus. Eine Darstellung des Enzyms aus dem Mycel des *Aspergillus niger* gibt K. FREUDENBERG<sup>1</sup>.

600 g grob gemahlene Myrobalanen werden in 3 Liter destilliertem Wasser 10 Minuten lang gekocht, danach wird abgesssen und der Rückstand noch 3—4mal mit je 2 Liter heiß ausgezogen. Die Flüssigkeit wird mit der Lösung von 300 g Ammoniumsulfat, 9 g Dikaliumphosphat und 3 g Magnesiumsulfat versetzt und auf 12 Liter aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird auf große flache Schalen derart verteilt, daß die Schichtdicke mindestens 4 cm beträgt. Nach dem Animpfen mit einer Aufschlammung von Sporen des *Aspergillus niger* bleibt die Flüssigkeit 3 Tage bei 33° stehen. Es hat sich ein straffes weißes Mycel gebildet, das in diesem Zustand die beste Ausbeute an Tannase ergibt. Der abgehobene Pilz wird mit sechsmal erneuertem Wasser durchgeknetet und jedesmal mit der Hand ausgepreßt. Der feuchte Pilz wird sodann mit 1 Liter Wasser und 1 ccm Toluol zu einem dünnen Brei angerieben und 24 Stunden unter häufigem Umrühren bei 20° sich selbst überlassen. Nun wird durch eine Lage Kieselgur abgesaugt und gewaschen. Das Mycel wird erneut mit 1/2 Liter Wasser und 0,5 ccm Toluol gewaschen und nach 2 Stunden abfiltriert. Die vereinigten Auszüge werden im Vakuum auf 30—40 ccm eingeeengt, durch Kieselgur geklärt und mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols versetzt. Die Tannase fällt in hellen Flocken, die sich nach einigem Schütteln filtrieren lassen. Das Präparat wird noch zweimal in 20 ccm Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Zuletzt wird mit Alkohol und dann mit Äther nachgewaschen und im Exsiccator getrocknet. Falls das hellgraue Pulver FEHLINGSche Lösung reduziert, muß es nochmals umgefällt werden.

Bestimmungsmethode der Tannase. Zur Messung der Tannasewirkung verwendet man zweckmäßig Gallussäuremethylester als Substrat. Die Bestimmungsmethode nach FREUDENBERG verzichtet auf Konstanthaltung der Wasserstoffzahl durch Pufferlösungen, die der Titration die Schärfe nehmen und Färbungen bewirken würden. In eine 1/2%ige Lösung von Gallussäuremethylester wird eine Menge des Enzympräparates gegeben, die in 4 Stunden bei 33° eine Spaltung zwischen 20 und 65% hervorruft. 20 ccm des Verdauungsgemisches werden zur Titration mit 0,025 n-Natronlauge verwendet.

#### d) Chlorophyllase.

Die Chlorophyllase ist eine spezifisch wirkende Esterase, die auf Chlorophyll und nahe verwandte Phytol ester (Phaeophytin) in wäßrigen Medien hydrolysierend wirkt, so daß Phytol abgespalten wird; in alkoholischen Medien bewirkt sie die Substitution der Phetylgruppe durch einfache Alphyle. Das Enzym ist ein wichtiges Reagens, um Chlorophyll in die Form einfacher Chlorophyllide überzuführen, die schwer löslich sind und gut kristallisieren.

Chlorophyllase ist in den chlorophyllhaltigen Gewächsen sehr verbreitet. Für die Darstellung von Enzympräparaten sind die frischen Blätter, z. B. von *Heracleum spondylium* (Bärenklau), *Galeopsis tetrahit* (Hohlzahn) *Stachys silvatica* (Waldziest), *Lamium maculatum* (Taubnessel) geeignet. Durch Fällen des frisch gewonnenen Preßsaftes der Blätter mit dem doppelten Volumen Alkohol erhält man ein Trockenpräparat, das das Enzym enthält. Das Enzym findet sich außerdem im Rückstand der Extraktion von getrockneten Blättern. Blattpulver wird mit 80%igem Aceton mehrmals extrahiert bis zur vollständigen Entfernung des Chlorophylls. In der trockenen Blattsubstanz findet sich das Enzym, das weder durch Wasser oder Alkohol noch durch Glycerin daraus extrahiert werden kann.

Das chlorophyllasehaltige Blattpulver büßt seine Wirksamkeit völlig ein, wenn ihm durch Waschen mit Wasser die Elektrolyte entzogen werden. Durch Zusatz von Calciumchlorid wird das ursprüngliche Wirkungsvermögen völlig wieder hergestellt.

<sup>1</sup> K. FREUDENBERG u. E. VOLLBRECHT: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 116, 272. — K. FREUDENBERG, F. BLÜMMEL u. TH. FRANK: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 164, 262.

**Bestimmungsmethode:** Am einfachsten läßt sich die Chorophyllasewirkung nach WILLSTÄTTER<sup>1</sup> bei der Hydrolyse des Chorophylls mittels eines Verfahrens quantitativ bestimmen, das auf der sauren Natur der freien Chlorophyllide beruht.

Man befeuchtet z. B. 0,5 g Chlorophyllasematerial (getrocknetes und extrahiertes Material) mit 1 ccm Wasser in einem weiten Reagensglas und läßt es 10 Minuten aufquellen. Darauf wird die Lösung von 6,5 mg reinem Chlorophyll (A+B) in 2 ccm Aceton zugefügt und gut mit dem Pulver verrieben. Um auch elektrolytarne Präparate bestimmen zu können, empfiehlt sich ein Zusatz von 5 mg Calciumchlorid. Nach 1 Stunde, während der man öfters umgerührt hat, wird die Lösung auf einer kleinen Nutsche abgesaugt und das Mehl mit 20—25 ccm reinem Aceton in sehr kleinen Anteilen langsam nachgewaschen. Die Farbstofflösung wird nun in einen Scheidetrichter zu 50 ccm Äther gegossen und durch Entmischen mit Wasser eine rein ätherische Pigmentlösung gebildet. Aus dieser führt man das freie Chlorophyllid in wäßrige Alkalilauge über, wofür dreimal 20 ccm 0,02 n-KOH genügen. Jedesmal werden beim Ausschütteln ein paar Kubikzentimeter Methylalkohol zugefügt. Die vereinigten alkalischen Auszüge werden sogleich im Meßkolben mit Methylalkohol auf 100 ccm aufgefüllt; die holzgeisthaltige Lösung ist viel beständiger als die wäßrige alkalische.

Den in der Ätherschicht hinterbliebenen, nicht hydrolysierten Anteil des Chlorophylls verseift man mit 5 ccm methylalkoholischer 28%iger Kalilauge, was in 5 Minuten vollständig ist. Durch zweimaliges Ausschütteln mit je 30 ccm Wasser wird das gebildete Chlorophyllinkalium extrahiert und die ätherische Schicht bleibt rein gelb zurück. Wiederum ergänzt man das Volumen mit Methylalkohol zu 100 ccm. Beide Chlorophyllinsalzlösungen werden sogleich im Colorimeter bei Tageslicht verglichen. Unter den angegebenen Umständen wird ungefähr die Hälfte gespalten.

## B. Kohlenhydratspaltende Enzyme.

Die Wirkung der kohlenhydratspaltenden Enzyme bezieht sich auf die Lösung glucosidischer Bindungen. Man hat zwei große Gruppen zu unterscheiden, nämlich die Hexosidasen, welche die Spaltung der einfachen Saccharide und Glucoside katalysieren, und die Polyasen, die den Abbau der höheren Kohlenhydrate, hauptsächlich der Stärke und des Glykogens, bewirken. Die Leistung der einzelnen Hexosidasen ist streng spezifisch; je nach den Bausteinen, die sie befähigt sind, abzuspalten, bezeichnet man die Enzyme als Glucosidasen, Fructosidasen und Galaktosidasen und unterscheidet wiederum unter  $\alpha$ - und  $\beta$ -Enzymen, je nach der Konfiguration des Zuckers, den sie abspalten. Die Polyasen teilt man zweckmäßig ein nach ihrer Wirkung auf die verschiedenen Substrate und unterscheidet deshalb Amylasen, Cellulasen, Lichenasen: diesen Enzymen schließt sich die pektinspaltende Pektinase und Pektase an.

### 1. Bestimmungsmethode der kohlenhydratspaltenden Enzyme.

#### a) Allgemeine Methodik.

Der Fortschritt der enzymatischen Kohlenhydrathydrolyse kann sowohl durch die Bestimmung der Menge der gebildeten reduzierenden Substanzen als auch durch Polarisation gemessen werden. Für den ersteren Fall wird man jede gebräuchliche Methode verwenden können, z. B. die Bestimmung reduzierender Zucker nach BERTRAND<sup>2</sup> oder die Methode nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL<sup>3</sup>). Auch die für die Blutzuckerbestimmung allgemein angewandte Mikromethode von HAGEDORN-JENSEN<sup>4</sup> kann sinngemäß auf die Bestimmung von kohlenhydratspaltenden Enzymen übertragen werden.

Das Prinzip der polarimetrischen Methode bei der Messung der Kohlenhydrathydrolyse ist folgender: Man kennt die maximale Drehung für die zur Polarisation kommende Zuckерlösung ( $R_{\max}$ ) und die maximale Drehung

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. STOLL: Ann. Chem. 1910, 378, 18; 1911, 380, 148; 1911/12, 387, 317; Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin: Julius Springer 1913.

<sup>2</sup> BERTRAND: Bull. Soc. Chim. biol. 1906, 35, 1285.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. SCHUDEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1918, 51, 780.

<sup>4</sup> HAGEDORN u. JENSEN: Biochem. Zeitschr. 1923, 135, 46; 137, 92.

nach vollständiger Hydrolyse des Zuckers z. B. von Saccharose ( $L_{\max}$ ), so daß die Gesamtdrehungsabnahme  $R_{\max} - L_{\max}$  beträgt. Die Prozentspaltung  $p$  im Augenblick der Unterbrechung der enzymatischen Hydrolyse berechnet sich zu:

$$p = \frac{R_{\max} - d}{R_{\max} - L_{\max}} \cdot 100,$$

wobei  $d$  der gefundene Polarisationswinkel nach der Stoppung ist.

Bei der polarimetrischen Bestimmung ist natürlich auf die Mutarotation der bei der Hydrolyse entstehenden Zucker zu achten. Man beschleunigt durch Zufügen von Natriumcarbonat die endgültige Einstellung, zugleich stoppt man die Einwirkung der Enzyme durch Soda vollkommen ab.

Gegenüber der polarimetrischen Bestimmung der Kohlenhydrathydrolyse treten andere Methoden, die sich ebenfalls auf die physikalische Änderung des Substrates während der Hydrolyse gründen, an Bedeutung zurück. So kann die Viskositätsänderung von Stärkekleister nach M. OLSSON<sup>1</sup> zur Messung der Amylasewirkung herangezogen werden.

### b) Spezielle Vorschriften zur Bestimmung der Carbohydrasen.

**a) Saccharase-Bestimmung** nach WILLSTÄTTER und Mitarbeitern<sup>2</sup>. Die Saccharoseinversion durch Invertin oder Saccharase wird polarimetrisch verfolgt. Die Ausführung einer Saccharasebestimmung geht auf folgende Weise vor sich: Bei fortlaufender Arbeitsweise hält man in einem Thermostaten von 30° eine 9,5%ige Zuckerlösung und eine 10%ige Mononatriumphosphatlösung als Puffer bereit. In Bestimmungskölbchen von 100 ccm Inhalt pipettiert man 50 ccm der Substratlösung (= 4,75 g Zucker) und 5 ccm Puffer. Hierauf wird die Saccharaselösung oder Hefesuspension einlaufen gelassen unter Anmerkung der Zeit des halben Auslaufes der Pipette und der Bestimmungsansatz mit Wasser von 30° auf 100 ccm aufgefüllt. Die Enzymmenge wird so gewählt, daß die halbe Spaltung in etwa 10–40 Min. erreicht ist. Nach 10–20 Min. werden 25 ccm dem Bestimmungskolben entnommen und in 5 ccm 2%igem Natriumcarbonat einfließen gelassen, wiederum unter Anmerkung der Zeit des halben Auslaufes der Pipette. Wenn eine Hefesuspension angewendet wird, muß mit Tierkohle filtriert werden, um zu einem klaren Filtrat zu gelangen und zwar sofort nach dem Vermischen mit Natriumcarbonat, da in diesem Falle die Abstopfung mit Natriumcarbonat keine quantitative ist. Nach 10 Minuten Stehen ist die Mutarotation beendet; die Lösung kann polarisiert werden. Die maximale Drehung für die zur Polarisation kommende Zuckerlösung (1,1875 g in 30 ccm) beträgt im 2 ccm-Rohr  $R_{\max} = +5,27^\circ$ , während bei vollständiger Inversion sich eine Drehung  $L_{\max} = -1,67^\circ$  einstellt, so daß die gesamte Drehungsabnahme  $6,94^\circ$  umfaßt. Die prozentuale Spaltung im Augenblicke der Stoppung berechnet sich zu  $p = \frac{5,27b - d}{6,94} \cdot 100$ , wobei  $d$  der gefundene Polarisationswinkel ist.

Die Zuckerinversion folgt nur annähernd dem Gesetz der monomolekularen Reaktion. Die Kurve der Invertinkinetik weicht deshalb etwas von der logarithmischen Kurve ab, wie aus Abb. 4 zu erkennen ist.

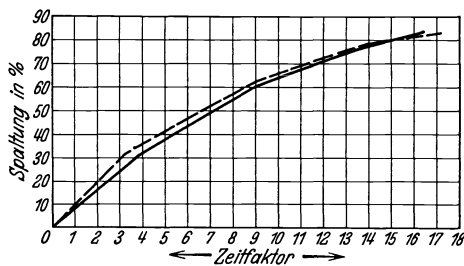


Abb. 4. Invertinkinetik.

<sup>1</sup> M. OLSSON: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 119, 1; 1923, 126, 26.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. STEIBELT: Zeitschr. physiol. Chem. 1920, 111, 157; 1921, 115, 211. — R. WILLSTÄTTER, J. GRASER u. R. KUHN: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 123, 1.



Als Maße für den Reinheitsgrad des Invertins gelten:

1. Der Zeitwert nach C. O. SULLIVAN und F. W. TOMPSON<sup>1</sup>. Er gibt die in Minuten gemessene Zeit an, die 0,05 g getrocknete Hefe oder der dieser Menge entsprechende Hefeauszug oder 0,05 g Präparat brauchen, um bei 15,5° 4 g Saccharose in 25 ccm Lösung, die 1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> enthält, bis zur Nulldrehung für Natriumlicht zu spalten.

2. Der Vergleichszeitwert nach WILLSTÄTTER und STEIBELT<sup>2</sup>. Die Null-drehungszeit ist nur für die Spaltung der Saccharose charakteristisch; daher ist der Zeitwert kein geeignetes Maß, wenn es sich darum handelt, die Wirkung von Hefen und Autolysaten gegenüber verschiedenen Zuckerarten und Glucosiden zu vergleichen. Der Vergleichszeitwert für Invertin gibt an, wieviel Minuten 0,5 g trockene Hefe oder Präparat brauchen, um 1,1875 g Saccharose, die in 25 ccm Lösung enthalten sind, bei 30° zu 50% zu spalten. Zwischen Zeitwert und Vergleichszeitwert besteht die empirische Beziehung: Zeitwert = 166 × Vergleichszeitwert.

Im Gegensatz zu den für andere Enzyme festgelegten Maßeinheiten sind Vergleichszeitwert und Zeitwert der enzymatischen Konzentration umgekehrt proportional. Die enzymatische Konzentration von Saccharasepräparaten wird daher nach dem Vorschlag von R. WILLSTÄTTER und R. KUHN<sup>3</sup> richtiger durch das Reziproke des Zeitwertes, den Saccharasewert, gekennzeichnet.

Als Maß für die Invertinmenge und damit für die Ausbeuten bei der Darstellung von Enzympräparaten dient in erster Linie die Saccharaseeinheit, das ist diejenige Enzymmenge, in 50 mg enzymhaltiger Substanz vom Zeitwert 1 unter den Bedingungen der Definition von C. O'SULLIVAN und F. W. TOMPSON.

Auswertung der Messung: Die prozentuale Spaltung im Augenblick der Stoppung berechnet sich zu  $p = \frac{5,27 - d}{6,94} \cdot 100$ , wobei  $d$  der gefundene Polarisationswinkel ist. Unter Zugrundelegung der experimentell gefundenen Zeit-Umsatz-Kurve (Abb. 4) beträgt der Zeitfaktor für 50%ige Spaltung 7,10 und die Halbspaltungszeit  $t_v = \frac{\tau}{T} \cdot 7,10$ , wenn  $\tau$  die Zeit vom Beginn der Inversion bis zur Stoppung und  $T$  der auf der Kurve abzulesende Zeitfaktor für den im Augenblick der Stoppung erreichten Spaltungsgrad ist.

Ist  $g$  die zur Spaltung von 25 ccm Bestimmungslösung angewandte Enzym-trockensubstanz in Milligrammen, dann ergibt sich aus der Halbspaltungszeit  $t_v$  laut Definition

$$\text{Vergleichszeitwert} = \frac{t_v \cdot g}{500}.$$

Der Zeitwert nach SULLIVAN und TOMPSON beträgt das 166fache des Vergleichszeitwertes und berechnet sich zu  $t_v \cdot g \cdot 0,332$ . Der Saccharasewert, das Reziproke des Zeitwertes, ist demnach  $S.V. = \frac{1}{t_v \cdot g \cdot 0,332}$ .

Die Zeit  $t_z$  für die Nulldrehung unter den Bedingungen von SULLIVAN und TOMPSON unter Verwendung derselben Enzymmenge  $g$  für 25 ccm ist  $t_z = t_v \cdot 16,6$ . Die angewandte Saccharasemenge beträgt  $\frac{1}{t_z \cdot g} = \frac{1}{t_v \cdot g \cdot 16,6}$  S.E. Für eine Enzymmenge  $M$  (g oder ccm), von welcher 4 g Einheiten (g oder ccm) bei der

<sup>1</sup> C. O'SULLIVAN u. F. W. TOMPSON: Journ. Chem. Soc. London 1890, 57, 834. Vgl. dazu H. v. EULER: Zeitschr. physiol. Chem. 1910, 69, 152; 1911, 71, 15; 1911, 73, 335; 1919, 107, 269. — R. WILLSTÄTTER u. F. RACKE: Ann. Chem. 1920/21, 425, 1.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. STEIBELT: Zeitschr. physiol. Chem. 1920, 111, 157; 1921, 115, 211.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. R. KUHN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1923, 56, 509.

Vergleichszeitwertbestimmung eine Halbspaltungszeit  $t_v$  ergeben, ist der Saccharasegehalt  $= \frac{M}{t_v \cdot g \cdot 16,6}$ .

**β) Maltase-Bestimmung.** Die enzymatische Wirksamkeit der Maltase wird nach WILLSTÄTTER und Mitarbeitern<sup>1</sup> durch den Zeitwert ausgedrückt, d. i. die Zeit, die 1 g getrocknete Hefe oder 1 g Maltasepräparat braucht, um bei 30° 2,5 g Maltosehydrat ( $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$ ) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese mit 0,5 g Phosphatmischung  $p_H = 6,8$  in 50 ccm enthalten sind. Das Tausendfache des Reziproken des Zeitwertes, das der enzymatischen Konzentration direkt proportional ist, bezeichnet man als Maltasewert. Die Enzymmenge in 1 g Trockensubstanz vom Zeitwert 1, also die Enzymmenge, welche 2,5 g Maltosehydrat unter den angegebenen Bedingungen in 1 Minute zu 50% spaltet, heißt Maltaseeinheit.

Die Kinetik der Maltase ist von Präparat zu Präparat verschieden; der Einfluß der verschiedenartigen Assoziationen des Enzyms kann bei der Bestimmung nicht vollständig ausgeschaltet werden. Die gefundenen Einheiten sind daher nicht absolut, sondern nur scheinbare. Bei Reinigungsoperationen, wie Tonerdeadsorption ändert sich die Kinetik. In der nebenstehenden Abb. 5 ist die Zeit-Umsatz-Kurve für rohes und gereinigtes Enzym ersichtlich. Zur Bestimmung der Zeit der 50%igen Maltosehydrolyse durch eine Maltaselösung ist es deshalb notwendig, auf Grund mindestens zweier Beobachtungszeiten den zeitlichen Verlauf der Spaltung zu prüfen.

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Maltosespaltung sind die Reduktionsmethoden und die polarimetrische Methode geeignet. Die letztere ist ihrer leichteren und schnelleren Handhabung wegen bedeutend vorteilhafter.

Man entnimmt der 30° warmen Versuchslösung, die aus 2,5 g Maltosehydrat 0,5 g Phosphat von  $p_H = 6,8$  und dem zu prüfenden Enzymmaterial in einem Volumen von 50 ccm besteht, mit der Pipette 25 ccm und trägt sie unter Berücksichtigung der Auslaufzeit in 5 ccm 2 n-Natriumcarbonatlösung ein. Nach raschem Durchschütteln im Reagensglas — bei Bestimmungen mit Hefe unter Zugabe von Tierkohle — filtriert man durch ein trockenes Filter und füllt mit der klaren Lösung zum Zwecke der Polarisation ein 2 cm-Rohr. Die Anfangsdrehung beträgt dann 10,80°, die Enddrehung bei vollkommener Spaltung würde 4,40°, die Drehungsabnahme also 6,40° betragen.

Beispiel. Die erste Entnahme von 25 ccm aus der Versuchslösung erfolgt z. B. 98,3 Minuten nach Beginn des Versuches. Der abgelesene Drehungswinkel sei 7,37°, die Drehungsabnahme also  $10,80^\circ - 7,37^\circ = 3,43^\circ$ . Daraus berechnet sich die Spaltung  $\frac{3,43 \cdot 100}{6,40} = 53,6\%$ . Eine zweite Stoppung nach insgesamt 161,5 Minuten ergebe eine Drehungsabnahme von 4,08°, und dementsprechend eine Spaltung von 63,8%. Unter Zugrundelegung der ersten Zeit-Umsatzkurve beträgt der Zeitfaktor für 50%ige Spaltung 6,40 und die Halbspaltungszeit

$$t_v = \frac{\tau}{T} \cdot 6,40,$$

wenn  $\tau$  die Zeit von Beginn der Enzymwirkung bis zur Stoppung und  $T$  der Zeitfaktor für den im Augenblick der Stoppung erreichten Spaltungsgrad ist. Aus der ersten Stoppung berechnet sich die Zeit für 50%ige Spaltung von 2,5 g Maltose zu 41,4, aus der Spaltung der zweiten Stoppung zu 41,0 Minuten.

Wenn als Enzymmaterial zum Versuch 2,2 g Hefe (entsprechend 0,55 g Trockensubstanz) angewandt werden, beträgt der Zeitwert der Hefe demnach  $41,2 \cdot 0,55 = 22,6$ . Der Maltase-

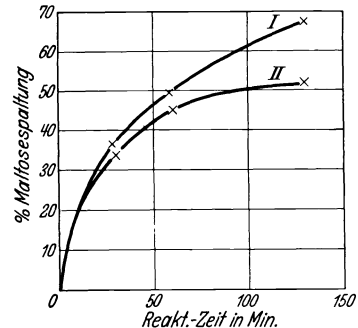


Abb. 5. Zeitumsatzkurve für Maltase.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER, TR. OPPENHEIMER u. W. STEIBELT: Zeitschr. physiol. Chem. 1920, 110, 232.

wert dieser Hefe ist:  $\frac{1 \cdot 1000}{22,6} = 44,2$ . In 0,55 g Trockenhefe sind enthalten  $\frac{1}{41,2} = 0,0243$  (scheinbare) Maltaseeinheiten.

**Bestimmung des Enzyms in der Hefe:** Ohne Zugabe von Zellgift kann die einsetzende Gärung die Bestimmung der Maltase stören. Man zerstört deshalb vor der Anwendung der Hefe zur Maltasebestimmung die Hefenzellen durch Zugabe von Zellgift. Man versetzt beispielsweise die 2,5 g Trockenhefe entsprechende Menge Frischhefe im Becherglas mit 1 ccm Essigester und verreibt mit einem Glasstab 5–10 Minuten lang bis zur vollständigen Verflüssigung, verdünnt mit Wasser und neutralisiert mit 0,1 n-Ammoniak. Die neutrale Hefesuspension wird in einem Meßkolben zu 50 ccm aufgefüllt. Zum Versuch entnimmt man mit der Pipette nach sorgfältigen Durchschütteln z. B. 20 ccm (1 g Trockenhefe entsprechend) zum Versuch.

Ähnlich kann man die Hefeverflüssigung mit feingemahlenem Diammoniumphosphat hervorrufen, wenn man eine Hefemenge, entsprechend 2,5 g Trocken-substanz, mit 1 g Diammonphosphat verrührt.

**γ) Emulsin-Bestimmung.** Als Maß für die Emulsinwirkung dienen die Zeitwerte der 50%igen Spaltung von Amygdalin, Prunasin und  $\beta$ -Methylglucosid, d. h. die Anzahl Minuten, die 1 mg Emulsinpräparat oder enzymhaltige Pflanzensubstanz brauchen würde, um bei 30° und optimalem  $p_H$  50% der theoretischen Glucosemenge abzuspalten, in 20 ccm Lösung aus 0,100 g Amygdalin (3 H<sub>2</sub>O enthaltend) bzw. 0,05765 g Prunasin bzw. 0,0793 g  $\beta$ -Methylglucosid (mit  $\frac{1}{2}$  Mol H<sub>2</sub>O). Unter theoretischer Menge werden verstanden 2 Mol Glucose aus Amygdalin, 1 Mol Glucose aus Prunasin und Methylglucosid.

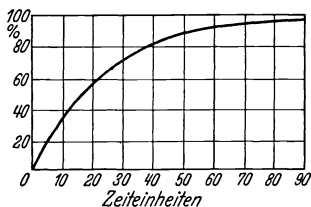


Abb. 6. Zeitlicher Verlauf der Amygdalin-Genosespaltung.  $p_H = 6$ ; 30°.

Die optimale Wasserstoffzahl für die Hydrolyse des Amygdalins ist  $p_H = 6$ , für Prunasin und  $\beta$ -Methylglucosid 4,9.

**Bestimmung des Emulsins nach WILLSTÄTTER und CZÁNYI<sup>1</sup>:** Die bei der Spaltung gebildete Blausäure wird abgedampft und die entstandene Glucose nach BERTRAND bestimmt.

Im Jenaer Rundkolben von 0,5 Liter Inhalt werden 10 ccm 1,0%ige Amygdalinlösung mit etwas Toluol, mit 2–4 ccm Puffermischung (0,1 n-Acetatgemisch im Verhältnis 20 Natriumacetat : 1 Essigsäure) und soviel Wasser versetzt, daß mit der hinzuzufügenden Enzymlösung das Volumen auf 20,0 ccm kommt, und im Thermostaten auf 30° vorgewärmt. Die Enzymlösung, 1–5 ccm, enthaltend 0,5–5 mg Emulsin oder die Suspension der Pflanzensubstanz, z. B. von 10 mg Pulver entölter Mandeln, wird unter Umschwenken eingegossen. Die Zeitmessung wird in der Mitte der Einflußdauer begonnen. Eine Vergleichsprobe zur Ermittlung der Eigenreduktion des Emulsins (die gering, oft ganz unerheblich ist), wird daneben in gleicher Weise, nur ohne Amygdalin angesetzt. Nach der Reaktionsdauer, gewöhnlich 30–60 Minuten, wird die Emulsinwirkung durch Zusatz von höchstens 2 ccm 10%iger Schwefelsäure unterbrochen. Dann wird die Flüssigkeit zur Vertreibung der Blausäure 30 Minuten einer Dampfdestillation unterworfen, und zwar so, daß das Volumen tunlichst unverändert bleibt und dann die Bestimmung nach BERTRAND vorgenommen.

**Beispiel.** Angewandt wurde ein mit Essigsäure angesäuertes ammoniakalischer Auszug aus entölten bitteren Mandeln (500 ccm aus 20 g) und davon 0,2 ccm (1 ccm der fünfmal verdünnten Lösung) zur Messung verwandt, entsprechend 8 mg Mandelpulver. Der Versuchsansatz war, wie oben beschrieben, die Einwirkungsdauer 60 Minuten. Nach BERTRAND wurden verbraucht 6,6 ccm 0,156 n-Permanganatlösung. Daraus ergeben sich 33,4 mg Glucose, das ist 47,5% Spaltung. Für diese Spaltung würde 1 mg auf Grund der Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Enzymmenge 480 Minuten erfordern. Aus der unten angegebenen Reaktionskurve (Abb. 6) der Amygdalinspaltung ergibt sich zum Spaltungsgrad

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. CZÁNYI: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 117, 172. — R. WILLSTÄTTER u. TR. OPPENHEIMER: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 121, 185.

von 47,5% der Abszissenpunkt 15,6, also zum Abszissenpunkt 17 der 50%igen Spaltung die Zeit von 523 Minuten. Das ist der Zeitwert der aus 1 mg entöltter Mandeln gewonnenen Emulsinlösung. Zur Bestimmung der Emulsinausbeute benutzt man zweckmäßig den „Menge-Zeit-Quotienten“, das ist der Quotient des in irgendeiner Form vorliegenden emulsinhaltigen Materials (mg) und seiner Wirkungszeit. Z. B. lieferten 20 g Mandeln vom Zeitwert 480 (Menge-Zeit-Quotient = 41,7), 0,55 g Emulsin vom Zeitwert 18 (Menge-Zeit-Quotient = 30,6); die Ausbeute beträgt somit 73,5%.

Die quantitativ weit geringeren Wirkungen des Fermentes auf andere Glucoside sind mit der 20–100fachen Menge (50–250 mg Emulsin oder 500 mg Pulver aus Mandeln) und in 6–40 Stunden auszuführen.

Auch die polarimetrische Methode kann zur Bestimmung der Emulsinwirkung herangezogen werden. Vgl. dazu Arbeiten von B. HELFERICH<sup>1</sup> und K. JOSEPHSON<sup>2</sup>.

δ) Galaktosidase-Bestimmung. Die Wirkung der Galaktosidase wird durch den Zeitwert in Minuten gemessen, also die Zeit, die 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung brauchen würde, um bei 30° und optimalem  $p_H = 7$  in 50 ccm Lösung 2,5 g Lactosehydrat zu 50% zu hydrolysieren. Als Substrat dient wasserhaltiger Milchzucker von  $[a]_D = + 52,53^0$ .

Zur Bestimmung der Lactasewirkung können die üblichen Reduktionsmethoden oder auch die polarimetrische Methode benutzt werden. WILLSTÄTTER und OPPENHEIMER<sup>3</sup> bestimmen die gebildete Glucose nach BERTRAND, indem sie 25 ccm der 10%igen Lösung von Lactose mit 10 ccm  $\frac{1}{3}$  mol-Phosphatpuffer nach SÖRENSEN von  $p_H = 7$  versetzt, mit der entsprechenden Enzymmenge und Wasser auf 50 ccm bringen. Die Reaktion geht bei 30° vor sich. Proben von 5 ccm werden entnommen und zum Abrechnen der Enzymwirkung in Meßkolben, die vorher mit 5 ccm 2 n-Natriumcarbonatlösung beschickt werden, eingetragen. Ein Fünftel des Gemisches wird zur Zuckerbestimmung verwendet. Der Natriumcarbonatzusatz ist ohne Einfluß auf die Permanganatmenge. Die Berechnung der Glucosemenge geschieht nach einer empirischen Tabelle.

Tabelle 7. Kupferzahlen der Gemische von Lactose und Glucose mit Galaktose.

Die Kupferzahlen wurden gewonnen, indem man 5%ige Lösungen der wasserhaltigen Lactose und der äquimolekularen Gemische von Glucose und Galaktose in verschiedenen Verhältnissen aus Büretten in 25 ccm-Kolben einfließen ließ, aus denen nach Erwärmen auf 30° 5 ccm entnommen und auf 100 ccm aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung dienten 20 ccm.

| Lactose<br>ccm | Glucose +<br>Galaktose<br>ccm | 0,160 n-Permanganat-<br>lösung<br>ccm |      | Kupfer<br>mg |      | Kupfer-<br>Mittelwert<br>mg |
|----------------|-------------------------------|---------------------------------------|------|--------------|------|-----------------------------|
| 1              | 0                             | 6,10                                  | 6,15 | 62,1         | 62,6 | 62,35                       |
| 0,9            | 0,1                           | 6,30                                  | 6,35 | 64,1         | 64,6 | 64,35                       |
| 0,8            | 0,2                           | 6,60                                  | 6,65 | 67,2         | 67,7 | 67,45                       |
| 0,7            | 0,3                           | 6,90                                  | 6,90 | 70,2         | 70,2 | 70,2                        |
| 0,6            | 0,4                           | 7,15                                  | 7,15 | 72,8         | 72,8 | 72,8                        |
| 0,5            | 0,5                           | 7,45                                  | 7,50 | 75,8         | 76,4 | 76,15                       |
| 0,4            | 0,6                           | 7,65                                  | 7,70 | 77,9         | 78,4 | 78,15                       |
| 0,3            | 0,7                           | 8,09                                  | 8,09 | 82,3         | 82,3 | 82,3                        |
| 0,2            | 0,8                           | 8,38                                  | 8,38 | 85,3         | 85,3 | 85,3                        |
| 0              | 1,0                           | 9,00                                  | 9,00 | 91,6         | 91,6 | 91,6                        |

Zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit herrscht in gewissen Grenzen Proportionalität; bei Anwendung zu kleiner Lactasemengen macht sich die Enzymzerstörung bemerkbar. Der zeitliche Verlauf folgt nicht dem Gesetze

<sup>1</sup> B. HELFERICH: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 117, 159. — B. HELFERICH, P. E. SPEIDEL u. W. TOELDTE: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 128, 99.

<sup>2</sup> K. JOSEPHSON: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 147, 1.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. TR. OPPENHEIMER: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 118, 170.

der monomolekularen Reaktion. Der Berechnung der Halbspaltungszeiten liegt folgende empirische gefundene Reaktionskurve zugrunde (Abb. 7).

ε) **Amylase-Bestimmung.** Zur Bestimmung der Amylasen werden wie bei den Hexosidasen hauptsächlich Reduktionsmethoden und die Polarisationsmethode verwendet. Aber auch physiko-chemische Änderungen des Substrates, wie Stärkeverflüssigung<sup>1</sup> und Nephelometrie<sup>2</sup> können zu ihrer Messung dienen. Letztere Methoden, die physikalischen Veränderungen des Substrates in den ersten Abbauphasen zu beobachten, sind weniger allgemein anwendbar und erlauben vielfach nur Schätzungen, sie haben aber den Vorzug der Einfachheit und werden medizinisch vielfach angewandt.

Hier soll nur die leicht ausführbare und für orientierende Versuche besonders geeignete kolorimetrische Methode nach J. WOHLGEMUTH<sup>3</sup> in der Modifikation nach L. MICHAELIS<sup>4</sup> näher beschrieben werden. Sie beruht auf der Änderung der Jodreaktion, die beim Auftreten bestimmter Stufen des Stärkeabbaus nicht mehr die blaue Farbe der Jodstärke, sondern je nach dem Grad des Abbaues violette, rote oder gelbrote Färbung gibt.

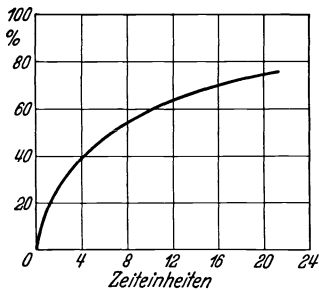


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Lactosespaltung.

Ausführung: Man beschickt eine Reihe Reagenzgläser mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Fermentlösung, die bei unbekannter Aktivität der Lösung so ausgewählt werden, daß die einzelnen Fermentmengen je um 100% differieren. Hierauf gibt man zu jedem Röhrchen, beginnend mit dem am wenigsten Ferment enthaltenden, 5 ccm einer 1%igen, gekühlten Stärkelösung (lösliche Stärke), die im Falle tierischer Amylasen 0,2% Natriumchlorid enthält, überschichtet mit Toluol und stellt sofort jedes Gläschen in ein Gefäß mit Eiswasser.

Die Eiskühlung soll zunächst jede Fermentwirkung ausschalten. Wenn sämtliche Gläschen in dieser Weise vorbereitet sind, werden alle zugleich in ein Wasserbad von 40° übertragen, so daß die Enzymwirkung in allen Bestimmungen zugleich einsetzt. Nach einer bestimmten Zeit (meist 30 Minuten) wird die Amylasewirkung durch Übertragung ins Eiswasser in allen Gläsern gleichzeitig unterbrochen. Sämtliche Gläser werden nun sofort bis zu einer bestimmten Marke mit Wasser aufgefüllt und mit 5 ccm einer äußerst stark verdünnten, ganz schwach hellgelben Jodlösung (etwa 0,001 n) versetzt; diese ist so verdünnt gewählt, um Versuchsfehler durch Pipettieren zu vermeiden, da eine geringe Differenz im Jodgehalt schon Einfluß auf die Farbnuance hat. Man beobachtet mit zunehmender Fermentmenge folgende Färbungen: dunkelblau, blauviolett, rotgelb und gelb. Die Rotgelben und Gelben enthalten abgesehen von Maltose und Glucose nur noch Dextrine, die blauvioletten enthalten ein Gemisch von Dextrinen und Stärke. Ist man im Zweifel, ob neben dem Dextrin noch unveränderte Stärke in einer Bestimmung vorhanden ist, so setzt man noch einige Tropfen Jod zu: Bleibt die blaurote Farbe erhalten oder vertieft sie sich noch, so ist die Grenze erreicht, geht der Farbton dagegen in rotbraun über, so hat das nächsthöhere Gläschen als Grenze zu gelten.

Als unterste Grenze der Wirksamkeit bezeichnet WOHLGEMUTH dasjenige Röhrchen, in dem zum ersten Mal die blaue Farbe unverkennbar auftritt, das also die violette Farbe zeigt. In dem Röhrchen mit der nächst höheren Enzymmenge ist dann alle Stärke zu Dextrin abgebaut. Dieses Röhrchen wird als Maß der Fermentwirkung gewählt und der Berechnung zugrunde gelegt. Als diastatische Kraft *D* mit dem Index von Versuchszeit und Temperatur bezeichnet WOHLGEMUTH die Anzahl Kubikzentimeter 1%iger Stärkelösung, die von 1 ccm Enzymlösung zu Erythrodextrin abgebaut werden. Zeigt z. B. ein Röhrchen, das 0,0125 ccm Speichel enthält, eben die rote Farbe bei 40° nach 30 Minuten, so geht die Berechnung so vor sich: 0,0125 ccm Speichel bauen in 30 Minuten

<sup>1</sup> M. OLSSON: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 119, 2; 1923, 126, 29.

<sup>2</sup> P. RONA u. v. EWEYK: Biochem. Zeitschr. 1924, 149, 174.

<sup>3</sup> J. WOHLGEMUTH: Biochem. Zeitschr. 1908, 9, 1.

<sup>4</sup> L. MICHAELIS: Praktikum der physikalischen Chemie. Berlin 1922, S. 132.

5 ccm 1%ige Stärkelösung ab: 1,00 ccm Speichel baut in 30 Minuten 400 ccm 1%ige Stärkelösung ab.  $D_{30}^{40} = 400$ .

Zur Messung des bei der Stärkehydrolyse gebildeten reduzierenden Zuckers wird entweder die Zuckerbestimmung nach BERTRAND oder einfacher die jodometrische Bestimmung der Maltose nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL angewandt.

Messung der Pankreasamylase nach WILLSTÄTTER und Mitarbeitern<sup>1</sup>. Die Pankreasamylase wird bei der optimalen Wasserstoffzahl von  $p_H = 6,8$  unter ausgleichender Aktivierung durch Natriumchlorid bestimmt. Die Hydrolyse von 0,25 g Stärke (in 37 ccm bei 37°) wird im Bereich der ersten 40% verfolgt. Die gebildeten Aldehydgruppen werden mit der Hypojodititration nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL gemessen.

Ausführung. In einer zylindrischen Standflasche mit eingeschliffenen Stopfen von 50 ccm Inhalt werden 25 ccm frisch bereiteter 1%iger Lösung von löslicher Stärke (Kahlbaum), 10 ccm 0,2 n-Phosphatpuffer, bestehend aus 5,1 ccm 0,2 n- $KH_2PO_4$  und 4,9 ccm 0,2 n- $Na_2HPO_4$ , sowie 1 ccm 0,2 n-NaCl vermischt und im Thermostaten auf 37° gebracht. Das Enzym fügt man unter Umschütteln hinzu. Nach Ablauf von gewöhnlich 10 Minuten wird die Reaktion durch Zusatz von 2 ccm n-HCl unterbrochen. Man spült das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser in einen ERLÉNMEYER-Kolben und führt nun die Aldosenbestimmung aus. Den Eigenverbrauch der Stärke sowie der Enzymlösung an Jod ermittelt man zu gleicher Zeit durch eine Kontrollbestimmung. Nach Abzug dieses Leerverbrauches wird die gefundene Jodmenge nach dem Verhältnis 17,15 mg  $C_{12}H_{22}O_{11}$  entsprechend 1 ccm n/10 Jod als Maltose ermittelt.

Unter der Annahme monomolekularen Reaktionsverlaufes wird die Konstante  $k = 1/t \cdot \log \frac{a}{a-x}$  berechnet. Als Anfangskonzentration  $a$  werden 75% von 0,25 g Stärke = 0,1875 g Substrat angenommen, das ist die im Grenzabbau umgesetzte Menge. Die Reaktionskonstante hat mit geeigneten Enzymmengen Werte zwischen 0,001 und 0,03 und drückt zugleich die Enzymmenge in Amylaseeinheiten aus.

Den enzymatischen Reinheitsgrad eines Amylasepräparates drückt der Amylasewert aus, nämlich die Anzahl Amylaseeinheiten in 10 mg der Substanz.

Messung der Leberamylase. O. HOLMBERGH<sup>2</sup> gibt eine quantitative Methode an zur Bestimmung der Leberamylase unter Natriumchloridaktivierung und bei optimalem  $p_H$ ; die Amylasebestimmung wird durch Bestimmung der gebildeten Maltose nach BERTRAND gemessen. Der Bestimmungsansatz besteht aus 20 ccm 2%iger löslicher Stärke, 10 ccm 0,29 N.-Phosphatpuffer von  $p_H = 6,9$ , 1 ccm n-Natriumchloridlösung, Toluol und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 42 ccm; Versuchstemperatur 37°. Als Maß der amylytischen Konzentration verwendet HOLMBERGH die Verzuckerungsfähigkeit nach EULER und SVANBERG.

$$Sf = \frac{k \cdot g \text{ Maltose}}{g \text{ Enzympräparat}},$$

wo  $k$  die monomolekulare Verzuckerungskonstante  $1/t \cdot \log \frac{a}{a-x}$ ,  $g$  Maltose die Anzahl  $g$  Maltose bedeutet, die bei der durch  $k$  gemessenen Reaktion in maximo gewonnen werden kann (75%). Für  $k$  nimmt man den Mittelwert aus mehreren Bestimmungen.

Messung der Speichelamylase. Für den Nachweis der Speichelamylase wird die WOHLGEMUTHSCHE Jodmethode in der Modifikation von MICHAELIS häufig angewandt. Sie erlaubt schnell zu einer Schätzung der amylytischen Wirkung zu gelangen. H. PRINGSHEIM und H. GORODISKI<sup>3</sup> erhalten streng vergleichbare Werte durch eine verbesserte Gewinnung des Speichels und durch Bestimmung der abgespaltenen Maltose nach BERTRAND.

Der Speichel wird nach einem immer gleichartigen Frühstück während 30 Minuten mit Hilfe eines Schwämmchen von 4–5 cm Durchmesser gesammelt. Als Substrat für eine Bestimmung dienen 50 ccm 2%ige Lösung von löslicher Stärke (Kahlbaum), die mit 2% Natriumchlorid und 20 ccm Phosphatpuffer (bestehend aus 3,8 ccm n/3 primärem Kaliumphosphat und 16,2 ccm n/3 sekundärem Natriumphosphat) versetzt werden. Es kommen 0,5–4 ccm Speichel bei Gegenwart von etwas Toluol und bei einer Temperatur von 37° zur Einwirkung. Zur Zuckerbestimmung werden 10 ccm des Reaktionsgemisches zu 5 ccm 5%iger Sodalösung gegeben, wodurch die amylytische Wirkung des Speichels abgebrochen wird, und nach BERTRAND titriert.

Speichel- und Leberamylase können auch nach der für die Pankreasamylase von WILLSTÄTTER ausgearbeiteten Methode bestimmt werden.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. R. F. HESSE: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 126, 143.

<sup>2</sup> O. HOLMBERGH: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 134, 68.

<sup>3</sup> H. PRINGSHEIM u. H. GORODISKI: Biochem. Zeitschr. 1923, 140, 175.

Messung der Malzamyase. Die Messung der Malzamyase lehnt sich ganz an die Methode an, die zur Bestimmung der Pankreasamyase beschrieben worden sind; nur die Aktivierung durch Neutralsalze kann bei den pflanzlichen Amylasen entfallen; außerdem findet man das Wirkungsoptimum des Malzenzyms bei einer stärker saueren Reaktion als das der tierischen Enzyme, nämlich bei einem  $p_H = 5,1 - 5,6$ . Es ist auch hier üblich, die Amylasewirkung reduktimetrisch entweder nach der Methode von BERTRAND oder der von WILLSTÄTTER und SCHUDEL zu messen. Im übrigen verfährt man, wie bei der Pankreasamyase beschrieben.

Ein ähnlicher Versuchsansatz, den EULER und SVANBERG<sup>1</sup> verwenden, ist folgender:

25 ccm meist 2%ige Stärkelösung, 10 ccm Phosphatgemisch (0,29 mol. Phosphatgemisch von  $p_H = 5,6$ ), Enzymlösung z. B. 1 ccm. Gesamtvolumen 36 ccm. Die Versuche werden in 100 ccm-ERLENMEYER-Kolben ausgeführt, die im Wasserbade auf konstante Temperatur gehalten werden. Das Enzym wird erst zugesetzt, wenn das Stärke-Phosphatgemisch die Temperatur von 37° angenommen hat. In bestimmten Zeitintervallen geschieht die Entnahme von Proben zu je 10 ccm Flüssigkeit; sie werden in 10 ccm 5%iger Natriumcarbonatlösung einpipettiert, wodurch die Reaktion vollkommen unterbrochen wird.

Die enzymatische Wirksamkeit von Amylasepräparaten läßt sich nach EULER und SVANBERG folgendermaßen ausdrücken:

$$Sf = \frac{k \cdot g \text{ Maltose}}{g \text{ Präparat}} ;$$

darin bedeutet  $k$  die monomolekulare Verzuckerungskonstante,  $g$  Maltose die Anzahl Gramm Maltose, wie sie bei der durch  $k$  gemessenen Reaktion maximal gewonnen werden kann (75%) und  $g$ -Präparat die Menge Enzymtrockensubstanz, welche auf die Stärke zur Wirkung kommt.

Die Enzymkonzentration soll so gewählt werden, daß bei 0,25–1,0 g Stärke in 36 ccm Versuchsansatz sich die Reaktionskonstante 0,004–0,08 ergibt.

## 2. Gewinnung und Reinigung der Hexosidasen.

### a) Fructosidase.

Das saccharosespaltende Invertin oder die Saccharase, wie sie sich in der Hefe findet, kann als das best untersuchte Enzym überhaupt angesehen werden. Die wichtigsten Erkenntnisse der Kinetik und des Reaktionsmechanismus der Enzymwirkung sind am Beispiel der Saccharase gewonnen worden.

Saccharosespaltendes Enzym findet sich in der Tier- und Pflanzenwelt; vor allem in der letzteren ist es weit verbreitet. Abgesehen von dem großen Vorkommen in den Kryptogamen z. B. in der Hefe, wird das Enzym in allen saccharosespeichernden Pflanzenteilen, wie in der Zuckerrübe beobachtet, aber auch überall da, wo höhere Kohlenhydrate, Stärke oder Inulin, als Reservestoffe dienen, tritt es auf. Die Verbreitung des Enzyms in der Tierwelt ist geringer; außer in der Honigblase und im Speichel Zucker invertierender Insekten findet sich Saccharase im Darm, in welchem sie von Cl. BERNARD aufgefunden worden ist. Die tierischen Saccharasen unterscheiden sich aber streng von den pflanzlichen hinsichtlich ihrer Spezifität: sie sind nicht wie das Enzym der Hefe Fructosidasen, sondern Glucosidasen<sup>2</sup>. Ihre Besprechung wird demgemäß in das Kapitel über Glucosidasen (S. 738) zu fallen haben.

Der präparativen Isolierung der Saccharase aus Hefe haben sowohl R. WILLSTÄTTER und seine Mitarbeiter, wie auch H. v. EULER eine größere Anzahl von Untersuchungen gewidmet. Die Isolierung des Enzyms besteht

<sup>1</sup> H. v. EULER u. SVANBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1920/21, 112, 193.

<sup>2</sup> R. KUHN: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 129, 57.

nicht in einem einfachen Lösungsvorgange; bei dem üblichen Verfahren des Zerreibens und Abpressens oder des Auslaugens mit Wasser geht nur ein verschwindender Bruchteil der Saccharase in Lösung. Aus den Arbeiten von WILLSTÄTTER<sup>1</sup> geht hervor, daß bei den verschiedenen Verfahren der raschen oder allmählichen Autolyse der Hefe, welche zu präparativ brauchbaren Ausbeuten an enzymatischer Substanz führen, die Auflösung der Saccharase auf einen enzymatischen Vorgang zurückzuführen ist, auf eine Freilegung des Enzyms, die einen genau bestimmten Teilvorgang des allgemeinen enzymatischen Abbaues der Hefesubstanz bildet. Die Lösung der Saccharase wird danach nicht durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme bewirkt, sondern durch die Einwirkung der Polyasen auf die Zellmembran.

**α) Saccharaseanreicherung in der Hefe.** Hefe ist nicht in jedem Stadium für die Saccharasegewinnung gleich günstig. Durch geeignete Gärführung gelingt es, die Saccharase in der Hefe anzureichern. Eine Methode von EULER<sup>2</sup> gründet sich auf die Hefeführung und Vergärung in konzentrierter Zuckermilch. Die dabei beobachteten Enzymvermehrungen werden nach WILLSTÄTTER<sup>3</sup> weit überholt, wenn man eine Gärführung mit minimaler Zuckerkonzentration anwendet, den Zucker langsam zutropfen läßt, wodurch auf die Hefe ein Reiz ausgeübt wird und, die damit in einen Zustand dauernder Gärbereitschaft versetzt wird.

Beispiel einer Gärführung. 200 g gut gewaschene und abgepreßte Hefe werden in 4 Liter Nährsalzlösung eingetragen, enthaltend je 8 g Kaliumnitrat und wasserhaltiges Magnesiumnitrat. Die Suspension wird in einem 10 Liter-Filterstutzen auf 28° vorgewärmt und auf dieser Temperatur gehalten. Die Flüssigkeit wird mit mechanischer Rührung, am besten mit Glasrührer, in starker Bewegung gehalten. 20%ige Saccharoselösung tropft aus einer tubulierten Flasche durch eine Capillare ein und zwar so, daß 100 ccm Lösung in 1 Stunde einfließen. Man trennt zweckmäßig die Hefe nach je 2 bis 3 Stunden von der alkoholischen Flüssigkeit und erneuert die Nährlösung. In den ersten 12 Stunden der Gärführung soll dies 3—4mal geschehen, während in den späteren Stunden — auch bei langsamerer Zuckermilchführung — erst nach 8—12 Stunden ein Wechsel nötig ist.

Der Fortschritt der Reaktion ist zu Beginn in Abständen von 2—3 Stunden, später in Abständen von 4—6 Stunden durch Bestimmung des Hefezeitwertes (s. S. 728) zu verfolgen. In einem Beispiel zeigte Hefe vom Zeitwert 148 nach 1½ Stunden Hefeführung einen Zeitwert von 63, nach 8 Stunden einen Zeitwert von 36 nach 17 Stunden einen von 20, nach 23 Stunden einen von 17,7.

**β) Freilegung des Enzyms nach WILLSTÄTTER<sup>4</sup>.** Die Bedingungen der Hefeautolyse sind von großer Bedeutung für die Menge und für die Natur der Begleitstoffe, die mit dem Enzym mit in die Autolysate übergehen. Die den Freilegungsprozeß lenkenden Faktoren sind die Auswahl der Hefe und des Zellgiftes, die Art der Abtötung der Hefe, die Reaktion der Autolysenflüssigkeit und die Dauer der Autolyse. Je nach der Wahl der Methode hat es der Untersucher in der Hand, Präparate mit oder ohne Gehalt an Hefegummi, mit oder ohne Eiweißgehalt, mit oder ohne Tryptophan und Tyrosingehalt zu gewinnen. Aus der großen Zahl der Varianten seien die drei wichtigsten Autolysenmethoden hier beschrieben:

I. Saure Autolyse mit Toluol. Hefe wird mit 10% ihres Gewichtes Toluol verrührt. Die Abtötung der Hefe erfolgt schnell, die Hefe verflüssigt sich. Darauf wird die Hefe in das gleiche Volumen Wasser eingetragen und der Autolyse 4—7 Tage überlassen. Nach wenigen Stunden setzt unter Gasentwicklung Selbstgärung ein, die bis zum folgenden Tage

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. F. RACKE: Ann. Chem. 1921, **425**, 1; **427**, 111.

<sup>2</sup> H. v. EULER u. Mitarbeiter: Zeitschr. physiol. Chem. 1919, **107**, 269.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER, CH. D. LOWRY u. K. SCHNEIDER: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **146**, 158.

<sup>4</sup> R. WILLSTÄTTER u. K. SCHNEIDER: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **133**, 194; 1925, **142**, 257. — R. WILLSTÄTTER u. F. RACKE: Ann. Chem. 1921, **425**, 1. — R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER u. E. BAMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **147**, 248. — R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER u. E. WENZEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, **151**, 1.



beendet ist. Die Suspension zeigt nach Eintreten der Hefeplastolyse auf Lakmus stark saure Reaktion, welche während der Freilegungsdauer beibehalten bleibt. Der Fortgang der Autolyse wird kontrolliert durch Messung des in die Lösung übergehenden Invertins. Zu diesem Zwecke wird eine kleine Probe über Faltenfilter unter Verwerfung des ersten Filtrates klar filtriert und mit 2 ccm der Invertingehalt des Autolysates bestimmt.

Beispiel der Ausbeutenberechnung. 20 kg Hefe (Trockengewicht 26,5%) vom Zeitwert 314, enthaltend 343 Saccharase-Einheiten, werden mit gleichem Volumen Wasser autolysiert. Wassergehalt der Hefe: 14990 ccm; Autolysenflüssigkeit (ideal filtriert gedacht) 35,3 Liter.

1. Bestimmung nach 50 Stunden: Für 2 ccm Halbdrehungszeit  $t_v = 22,2$  Minuten.

Ausbeute  $\frac{35300}{0,5 \cdot 16,6 \cdot 22,2} = 192$  Einheiten, das ist 58%.

2. Bestimmung nach 72 Stunden: Für 2 ccm Halbdrehungszeit  $t_v = 16,55$  Minuten.

Ausbeute: 257 Einheiten, das ist 76%.

3. Bestimmung nach 103 Stunden: Für 2 ccm Halbdrehungszeit  $t_v = 12,6$  Minuten.

Ausbeute 337 Einheiten, das ist 98%.

Die Auszüge der sauren Autolysate zeigen gelblichbraune Färbung, haben einen Geruch nach nativen Eiweißstoffen und geben sämtliche Eiweißreaktionen. Das Invertin ist in ihnen bei Aufbewahrung unter Toluol jahrelang haltbar.

II. Verfahren der raschen Autolyse mittels Chloroform bei neutraler Reaktion. 5 kg Hefe vermischt man am besten in einem Steinzeugtopf mit 5—6% ihres Gewichtes an Chloroform und durchknetet sie mit starken Holzstäben innig mit dem Zellgift. Nach 5 Minuten wird bei ununterbrochener Bearbeitung die Hefemasse breiig und in weiteren 5 Minuten bei fortdauernder Rührung flüssig. Man versetzt hierauf die verflüssigte Hefe mit dem gleichen Gewicht Wasser und neutralisiert die während der Verflüssigung entstandene Säure mit 10%igem Ammoniak. Nun läßt man unter steter Rührung die Autolyse bei Zimmertemperatur weitergehen und stellt in kurzen Zwischenräumen durch Neutralisation auf Lackmus  $p_{\text{H}} = 7$  ein. Die produzierten Säuremengen differieren bei den einzelnen Hefeproben. Die Autolyse darf nur so lange fortgeführt werden, wie es die Freilegung erfordert. Nach 48 Stunden ist sie gewöhnlich beendet. Nach beispielsweise 8, 24, 30 und 48 Stunden werden Proben herausgenommen, um die Ausbeute in Prozenten des Saccharasegehaltes der Hefe zu ermitteln (vgl. vorhergehendes Beispiel). Nach Beendigung der Autolyse trennt man die Heferückstände durch Zentrifugieren ab und klärt die Auszüge allenfalls durch Filtrieren mit Kieselgur.

Die so erhaltenen Auszüge sind nur schwach grünlichgelb gefärbt; sie enthalten eine sehr große Menge durch Säure fällbares Hefeeiweiß. Das Hefeeiweiß bleibt unter den Bedingungen der Neutralautolyse in annähernd nativem Zustande im Auszuge, muß aber, um eine Assoziation der Eiweißbauprodukte mit dem Invertin zu vermeiden, möglichst bald von diesem abgetrennt werden. Diese frischen Neutralauszüge erheischen also eine rasche Verarbeitung (s. Reinigung durch Adsorption).

III. Verfahren der fraktionierten Autolyse. Bei der Abtötung der Hefe durch Zellgift tritt ein an Saccharase armer, an Hefegummi und anderen Fremdkörper verhältnismäßig reicher Saft aus. Durchschnittlich sind nach Verflüssigung der Hefe bei Austritt von 4—10% des Enzyms schon 20% des Gesamttrockengewichtes der Hefe in Lösung gegangen, während bei völliger Freilegung des Enzyms erst 40—50% der angewandten Trockenhefe gelöst sind. Eine Verbesserung der enzymatischen Konzentration in den Auszügen ist daher gewonnen, wenn man die Hefe nach vollständiger Verflüssigung von der ausgetretenen Flüssigkeit abtrennt und von neuem mit Toluolwasser von 30° zur Freilegung des Enzyms ansetzt. Dabei tritt hinsichtlich der Reinheit und Verwendbarkeit der Autolysate ein Unterschied ein, je nachdem, ob die Verflüssigung und Autolyse bis zur Fraktionierung bei neutraler oder saurer Reaktion durchgeführt wird.

Die invertinreiche Hefe verrührt man bei 30° mit  $\frac{1}{10}$  ihres Gewichtes Toluol und knetet sie mit dem Zellgift stark durch; die Verflüssigung geht bei dieser Temperatur rasch vor sich. Der Brei wird dünnflüssig. Die Autolyse wird ohne Wasserzusatz oder unter Verdünnung mit der dem Hefegewicht entsprechenden Menge Wasser bei 30° 2—3 Stunden durchgeführt. Nach dieser Zeit füllt man so weit auf, daß 100 g Hefe in 300 ccm Wasser suspendiert sind, mischt innig durch und trennt in einer Zentrifuge die Heferückstände ab. Diese werden hierauf mit ebensoviel Wasser, wie zuvor angewendet, gewaschen, indem die Hefe in den Zentrifugenbechern mit geringer Wassermenge zunächst angeteigt und dann sehr gut mit dem Wasser durchgemischt wird. Nach Abschleudern des Washwassers werden die Heferückstände mit dem gleichen Volumen toluolgesättigten Wasser als dem Gewicht der ursprünglich angesetzten Hefe entspricht, unter Zusatz von Toluol aus den Bechern herausgespült und die Autolyse nimmt bei 30° ihren Fortgang. Um den zeitlichen Verlauf der Freilegung zu verfolgen, werden in gewissen Zeitabständen (4, 8, 12 Stunden) Proben von 5 ccm entnommen, welche klar filtriert zur Bestimmung des ausgetretenen Invertins verwendet werden. Hat die Ausbeute 85—100% der noch vorhandenen

Hefesaccharase erreicht, so wird die Freilegung unter Vermeidung unnötig langer Dauer abgebrochen. Die Dauer der Autolyse nach der Fraktionierung wechselt zwischen 6 bis 24 Stunden. Die Autolysate enthalten Hefeeiweiß. Um es abzutrennen, wird vor dem Abschleudern der Heferückstände mit Essigsäure auf  $p_H = 3,5-4$  eingestellt, zweckmäßig nach vorhergehender Verdünnung auf das 4—5fache der Enzymlösung. Nach dem Zentrifugieren und eventueller Filtration über Kieselgur neutralisiert man die Flüssigkeit mit Ammoniak. Diese Auszüge zeigen einen Zeitwert von 2,5—4,5 und sind zur weiteren Reinigung durch Adsorption gut geeignet. Die fraktionierte Autolyse kann auch unter Neutralisation mit verdünntem Ammoniak der Voraulyse vor sich gehen. Es resultieren reinere Autolysate mit günstigerem Zeitwert.

**γ) Reinigung der Saccharase.** Es ist im allgemeinen nicht möglich, eine Methode als die beste zu beschreiben. Durch die Anreicherung des Enzyms in der Hefe mittels Gärführung gelingt es, Autolysate herzustellen, die schon nach wenigen Reinigungsoperationen zu sehr hochwertigen Präparaten führen. Bei allen Reinigungsverfahren ist zu beachten, daß das bei Adsorptions- und Fällungsoperationen beobachtete Verhalten nicht das des Enzyms selbst ist, sondern durch den Einfluß mehr oder minder unbestimmter und von Fall zu Fall wechselnder Assoziationen mit verschiedenartigen Begleitern nur vorgetauscht wird. Die einmal gewonnenen Erfahrungen sind daher nicht ohne weiteres auf Enzymlösungen anderer Vorgeschichte zu übertragen. Im folgenden werden einige Beispiele zur Reinigung der Saccharase nach dem Verfahren von WILLSTÄTTER und Mitarbeitern<sup>1</sup> gegeben.

Beispiel 1. Reinigung durch Adsorption an Kaolin. Das angewandte Autolysat vom Zeitwert 3,6 war durch rasche und fraktionierte Autolyse bei neutraler Reaktion gewonnen aus invertinreicher Hefe. Das Enzym wurde in 0,2 n-Essigsäure bei einer Verdünnung von 1 Saccharaseeinheit in 1 Liter mit Kaolin adsorbiert. Zu 200 ccm Hefautolysat werden 1100 ccm Wasser und unter Umrühren 250 ccm 2 n-Essigsäure und 21,3 g Kaolin (in 200 ccm Wasser aufgeschlämmt) gegeben, das Adsorbat abgenutscht und gut ausgewaschen. Die Elution mit 0,5% iger Diammonphosphatlösung ergab 77% Ausbeute. Nach der Ausfällung von Phosphorsäure mit Magnesiamixtur und der Dialyse in Fischblasen, die ohne Verluste verlief, besaß das Invertin den Zeitwert 0,177. Dieser Reinheitsgrad ließ sich nicht verbessern. Nach der Adsorption an Tonerde und Elution mit Ammoniumphosphat lag das Enzym im nämlichen Reinheitsgrad vor. Diese Methode führt zu Präparaten, die meist frei sind von Hefegummi, aber schwache Millon-Reaktion und einen mittleren Tryptophangehalt zeigen. Die Präparate sind sehr beständig.

Beispiel 2. Reinigung durch Alkoholfällung und Tonerdeadsorption. Ein frisch bereitetes Autolysat, das wie oben gewonnen war (1,5 Liter enthaltend 0,9 Saccharaseeinheiten, Zeitwert 1,15), wurde auf 0° abgekühlt und mit n-Essigsäure (5 ccm) zu einem  $p_H = 5$  angesäuert. Beim Vermischen mit dem gleichen Volumen auf  $-20^{\circ}$  gekühlten Alkohols fiel eine geringe Menge Niederschlag aus, zu wenig und fein zum Zentrifugieren. Man saugte die Suspension auf zwei Nutschen durch Filter ab, die mit einer 1 mm dicken Schicht von Kieselgur bedeckt waren. Die Kieselgurschicht kann leicht vom Papier abgelöst und durch Verrühren mit Wasser daraus eine klar filtrierbare Enzymlösung gewonnen werden. Sie enthielt in 370 ccm 20,7 Saccharaseeinheiten vom Zeitwert 0,45. Die Invertinlösung wurde auf 92 ccm bei Zimmertemperatur im Hochvakuum eingeeengt. Bei dieser hohen Konzentration adsorbierte man mit 0,40 g Tonerde  $C\gamma$  (in 40 ccm Wasser) 18,7 Einheiten. Das dreimal gewaschene Adsorbat lieferte in  $\frac{1}{2}$  Liter Wasser suspendiert, beim Versetzen mit 4 g Diammoniumphosphat und Umschütteln in 5 Minuten eine erste Elution, die 13 Saccharaseeinheiten enthielt. Der Reinheitsgrad des Präparates entsprach einem Zeitwert von 0,137. Es war frei von Hefegummi und enthielt 2% Tryptophan.

Die so gewonnenen Invertinpräparate können auch durch systematische Fraktionierung an Kaolin und Tonerde nicht weiter gereinigt werden. Die Anwendung anderer Reinigungsmittel erlaubt jedoch noch eine bemerkenswerte Steigerung der enzymatischen Konzentration. So können durch fraktionierte Ausfällung mit Tannin bei tiefer Temperatur noch Fraktionen vom Zeitwert 0,125 bis 0,11 erhalten werden. Wichtiger ist noch die Anwendung eines adsorbierend

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. K. SCHNEIDER: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **133**, 193; 1925, **142**, 257. — R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER u. WENZEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **151**, 1. — R. WILLSTÄTTER, K. SCHNEIDER u. E. BAMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **147**, 248.

wirkenden Niederschlag von Bleiphosphat, der in der Enzymlösung selbst erzeugt wird. Dieses Adsorbens gestattet, die gereinigten Invertinlösungen so zu fraktionieren, daß aus den letzten Anteilen des Bleiphosphatniederschlag Invertin vom Zeitwert 0,10 erhalten wird. Das Verfahren gewinnt noch an Bedeutung dadurch, daß es mit seiner Hilfe gelingt, das Invertin von den Produkten seiner Inaktivierung abzutrennen.

Beispiel der Reinigung mit Bleiphosphat. 10,4 Saccharaseeinheiten, durch Kaolin und Tonerde gereinigtes Invertin vom Zeitwerte 0,17, fällt man zweimal mit je 0,15 g Diammoniumphosphat und entsprechendem Bleiacetat. Die vereinigten Adsorbate werden mit einigen Tropfen 0,5%iger Diammoniumphosphatlösung in einer Reibschale feinst verrieben und dann in 150 ccm des Eluens suspendiert. Nach 3 Stunden wird über Kieselgur filtriert. Die dialysierte Elution enthält das Enzym nur sehr unrein, während das Enzym der Restlösung sich durch höheren Reinheitsgrad und Beständigkeit auszeichnet. Die klare, sofort von Bleiphosphat frei erhaltene Restlösung enthielt 2,15 Einheiten, nach Eindampfen und Dialyse ebensoviel vom Zeitwert 0,104.

### b) $\alpha$ -Glucosidasen.

a) Maltase. Die Maltase katalysiert die Spaltung von Maltose in zwei Mol Glucose. Sie ist im tierischen und pflanzlichen Organismus weit verbreitet und findet sich gewöhnlich zusammen mit dem stärkespaltenden Enzym, der Amylase, durch deren Wirkung die Maltose gebildet wird und mit der zusammen die Maltase den Abbau der Kohlenhydrate zur Glucose vollzieht. Eingehend beschrieben ist nur die Maltase der Hefe, in der sie reichlich vorkommt.

Die spezifische Wirkung der Hefemaltase scheint verschieden zu sein von der anderer Herkunft. Man kann die Hefemaltase als Glucosido-Maltase bezeichnen<sup>1</sup>; außer Maltose ist sie befähigt auch  $\alpha$ -Methyl (Phenyl- usw.)-glucosid zu spalten. Als Erklärung wird angegeben, daß sich das Enzym an den Glucosideteil der Maltose anlagert. Im Gegensatz dazu spaltet Maltase aus Gerstenmalz, Aspergillus usw. nur Maltose. Es wird angenommen, daß sich dieses Enzym an den Glucoseteil der Maltose anlagert; deshalb wird sie als Gluco-Maltase bezeichnet.

Darstellung von Maltaselösung aus Hefe nach WILLSTÄTTER und Mitarbeitern<sup>2</sup>. Autolyse mit Essigester. Die scharf abgepreßte Hefe verrührt man mit Essigester (10 ccm auf 100 g Frischhefe) bis zur Verflüssigung, die in etwa 5—10 Minuten vollständig wird. Die dünnbreiige Masse bleibt etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde stehen, während der Säurebildung erfolgt. Darauf verdünnt man mit Wasser und stellt mit verdünntem Ammoniak neutrale Reaktion her. Die zur Analyse herausgenommenen Proben zeigen die zweckmäßige Dauer der Autolyse an. Bei höchstens eintägigem Stehen gehen 95—100% der Maltase in Lösung, in zu langer Versuchsdauer bei Zimmertemperatur kann die Ausbeute zurückgehen. Das Autolysat wird hierauf durch Zentrifugieren vom Hefeschlamm getrennt.

Um Maltaselösungen von höherem Reinheitsgrad zu erhalten, empfiehlt es sich, kurze Zeit nach dem Verdünnen mit Wasser, nach etwa 60 Minuten, durch Zentrifugieren die bei der Hefeverflüssigung und kurz danach ausgetretenen Stoffe abzutrennen und die wieder mit Wasser und Essigester angesetzte Hefemasse einen Tag der Autolyse zu überlassen.

Autolyse durch Diammoniumphosphat. Die Frischhefe wird mit 10% ihres Gewichtes an feinst gepulvertem Diammoniumphosphat bis zur Verflüssigung verrührt und nach etwa 1 Stunde mit Wasser, dem 10fachen Volumen auf Trockenhefe berechnet, verdünnt. Das Neutralisieren fällt hierbei weg. Gewöhnlich ist die Maltase in 5—8 Stunden quantitativ in Lösung übergeführt.

Die Maltase ist im Vergleich zur Saccharase weit unbeständiger. Sie geht, in Autolysaten bei 0° dargestellt, stets innerhalb eines Tages vollständig zugrunde. Es empfiehlt sich, Maltaselösungen stets bei 0° aufzubewahren. Auch

<sup>1</sup> J. LEIBOWITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 149, 185. — J. LEIBOWITZ u. MECHLINSKI: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 154, 64.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. BAMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 151, 242.

gegen Säure ist das Enzym sehr empfindlich, weswegen eine Neutralisation während der Autolyse unumgänglich notwendig ist.

Trennung der Maltase und der Saccharase<sup>1</sup>. Befreiung der Saccharase von der Maltase. In 10 ccm kaltes Hefeautolysat wurde die ebenfalls auf 0° gekühlte Suspension des kurz gealterten Tonerdegels C (entsprechend 0,20 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) eingetragen und nach Durchschütteln die Restlösung vom Adsorbat durch Zentrifugieren getrennt. Das Adsorbat wird in der Zentrifuge einmal mit Eiswasser gewaschen. Die Restlösung ist so gut wie maltasefrei; ihr Gehalt an Saccharase belief sich auf 81% der angewandten Menge.

Befreiung der Maltase von der Saccharase. Die Abtrennung der Saccharase aus dem Hefeautolysat wurde mit dem Gel AlO(OH) ausgeführt, wiederum bei 0°. Auf 10 ccm Autolysat werden etwa 0,65 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> verwendet. Das mit Wasser ausgewaschene Adsorbat ist so gut wie saccharasefrei, während Invertin und ein Bruchteil der Maltase in der Restlösung zurückbleiben. In manchen Fällen wird der einmaligen Gesamtadsorption eine Adsorption in mehreren Anteilen vorzuziehen sein.

Trennung von Maltase und Saccharase durch auswählende Elution. Primäres Phosphat bei 0° als Eluens angewandt, besitzt die Eigenschaft aus Tonerdeadsorbaten die Saccharase in ein- oder mehrmaliger Operation vollständig herauszulösen, während die Hauptmenge der angewandten Maltase im Adsorbat bleibt, so daß sie nachher durch Diammonphosphat frei von Saccharase eluiert werden kann. Die Elutionszeiten und die Menge des anzuwendenden Eluens sind nicht für alle Versuche gleich. Im allgemeinen beträgt die Elutionszeit für primäres Phosphat (0,5 g auf etwa 0,15 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 1—3 Stunden, für sekundäres Phosphat bei gleichen Mengenverhältnissen etwa 30 Minuten.

Maltase anderer Herkunft: Maltase wurde im Pflanzen- und Tierreich häufig beobachtet, doch wurden außer bei Hefemaltase nur noch bei der Gerstenmaltase größere Erfahrungen gesammelt. PRINGSHEIM und Mitarbeiter<sup>2</sup> konnten in Malzauszügen die Amalyse von der Maltase trennen (vgl. S. 744).

Maltasehaltige Malzauszüge gewinnt man nach diesen Forschern auf folgende Weise: 177 g Darrmalz werden mit 607 ccm Wasser und einigen Tropfen Toluol übergossen und nach zweitägigem Stehen im Eisschrank abgenutscht. L. LEIBOWITZ<sup>3</sup> stellt Maltaselösungen in ähnlicher Weise her. 350 g Trockenmalz läßt man mit 7 Liter Toluolwasser 24 Stunden im Eisschrank stehen. Die filtrierten Auszüge werden sofort im kontinuierlichen Dialysator von GUTBIER durch Pergamentpapier gegen fließendes Wasser 2—4 Tage bis zum Verschwinden der reduzierenden Bestandteile dialysiert.

Das Enzym zeichnet sich durch besondere Stabilität aus und besitzt seine optimale Wirksamkeit bei  $p_H = 4,5-5$ .

**β) Gluco-Saccharasen.** Gewisse saccharasespaltende Enzyme unterscheiden sich in ihrer spezifischen Wirkungsweise von der Saccharase der Hefe; sie greifen nämlich Saccharase vom Glucoseteil des Moleküls an und spalten nur solche Derivate der Saccharose, in denen der Glucosebaustein freiliegt. So unterliegt Raffinose nicht der Spaltung durch Gluco-Saccharasen. Durch  $\alpha$ -Glucose werden sie gehemmt im Gegensatz zur Hefesaccharase, die nur durch Fructose gehemmt wird. Das Hefeinvertin stellt eine Fructosidase dar, während das Enzym aus *Aspergillus Oryzae* und tierische Saccharase, wie sie beispielsweise im Darm vorkommt, zu den Gluco-Saccharasen zu rechnen sind.

Näher untersucht sind nur die Takasaccharase<sup>4</sup> *Aspergillus Oryzae* und die Saccharase des Darmes. Das  $p_H$ -Optimum beider Enzyme liegt zwischen 6—8, also gegenüber dem Hefeenzym nach der alkalischen Seite hin verschoben.

Die Bestimmungsmethode der Gluco-Saccharase schließt sich ganz der für die Hefesaccharase ausgearbeiteten Methode an. Die Konzentration, in der das Enzym im Darm vorliegt ist äußerst gering. Ein Versuchsansatz, den EULER und SVANBERG<sup>5</sup> wählen, setzt sich folgendermaßen zusammen:

<sup>1</sup> Siehe Fußnote 2, S. 738.

<sup>2</sup> H. PRINGSHEIM, A. GENIN u. R. PEREWOSKY: *Biochem. Zeitschr.* 1925, **164**, 117.

<sup>3</sup> J. LEIBOWITZ: *Zeitschr. physiol. Chem.* 1925, **149**, 184; 1926, **154**, 64.

<sup>4</sup> R. KUHN u. GRUNDHERR: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1926, **59**, 1655.

<sup>5</sup> H. v. EULER u. O. SVANBERG: *Zeitschr. physiol. Chem.* 1921, **115**, 43.

4,8 g Rohrzucker in 50 ccm Wasser gelöst, 10 ccm 0,3 m.-Phosphatlösung  $p_H = 6-7$ ; als Enzymmaterial wird z. B. 12 ccm fein zerschnittener Schweinedarm oder ein wäßriger Extrakt daraus verwendet. Die Dauer des Versuchs beträgt 9 Tage. Nach dieser Zeit wird bis zur Klarheit filtriert und durch Polarisation die Enzymwirkung bestimmt.

### c) $\beta$ -Glucosidase.

#### $\beta$ -Glucosidase des Emulsins und der Hefe.

Die Spaltung des natürlichen Glucosides Amygdalin in den bitteren Mandeln in 2 Mol  $\beta$ -Glucose, Benzaldehyd und Blausäure wurde bis jetzt auf das Zusammenwirken dreier Enzyme zurückgeführt, die man unter den Namen Emulsin zusammengefaßt hat. Die erste Stufe der Reaktion besteht in der Abspaltung von einem Molekül Glucose durch die sog. Amygdalase: In der zweiten Phase der Reaktion erfolgt die Lösung der glucosidischen Bindung zwischen dem Benzaldehydcyanhydrin und dem zweiten Molekül Glucose; sie wurde auf ein besonderes  $\beta$ -glucosidisches Enzym, auf die sog. Prunase, zurückgeführt. Für die dritte Reaktionsstufe endlich, die Spaltung des Benzaldehydcyanhydrins in seine Komponenten, wird die Existenz einer Oxynitrilase angenommen, deren Eigenschaften noch wenig sicher gestellt scheinen. Eine partielle Hydrolyse erleidet Amygdalin nach E. FISCHER<sup>1</sup> durch Hefe und deren Auszüge; dabei entsteht neben Glucose, das Mandelnitrilglucosid, das sog. Prunasin.

Indes konnte R. WEIDENHAGEN<sup>2</sup> in der neuesten Zeit wahrscheinlich machen, daß ein und die nämliche  $\beta$ -Glucosidase im Emulsin beide Glucosebindungen des Amygdalins angreift, nur geht die Ablösung des ersten Glucosemoleküls, die Aufspaltung des Gentiobioseteils also, wesentlich rascher vor sich als die Prunasin-spaltung. Auf diese schwerere Angreifbarkeit ist es zurückzuführen, daß E. FISCHER eine partielle Hydrolyse durch Hefeamygdalase durchführen konnte; steigert man nämlich die Konzentration des Hefeenzym bis zu Konzentrationen, wie sie im Emulsin vorliegen, d. h. ungefähr 300fach, so ist auch hier die Prunasin-spaltung ebenso groß wie durch Emulsin. Auch die Hefeamygdalase ist eine  $\beta$ -Glucosidase und in ihrer Wirkungsweise identisch mit dem Enzym des Emulsins.

Die  $\beta$ -Glucosidase des Emulsins vermag außer Amygdalin und Prunasin auch andere  $\beta$ -Glucoside zu spalten, wie Helicin, Salicin,  $\beta$ -Phenylglucosid,  $\beta$ -Methylglucosid und Arbutin.

Darstellung wirksamer Emulsinpräparate nach WILLSTÄTTER und CZÁNYI<sup>3</sup>. Bittere Mandeln werden zum Enthäuten in Wasser von 60–70° eine Viertelstunde erwärmt. Sie werden oberflächlich an der Luft getrocknet, in der Mühle zerkleinert und in der hydraulischen Presse zum größten Teil vom Öl befreit. Darauf werden sie mit der dreifachen Menge Äther in einer Flasche extrahiert, nach dem Absaugen in der Walzmühle gemahlen und nochmals mit der doppelten Menge Äther ausgezogen, abgesaugt und nachgewaschen. Das in einem warmen Luftstrom getrocknete Material wird in einer Siebmühle aufs feinste gemahlen. Das Pulver wird jeweils für die Bestimmung im Exsiccator getrocknet. Beim Aufbewahren nimmt seine enzymatische Kraft ab; z. B. in einem halben Jahr um 10%.

100 g Mandelpulver werden in einer Flasche mit 250 ccm 0,1 n-Ammoniak verrührt, darauf mit 100 ccm Wasser 5 Stunden lang mit der Maschine geschüttelt. Den ammoniakalischen Auszug trennt man mittels der Zentrifuge von den Rückständen, um diese sogleich in den Zentrifugengläsern wieder mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von 10 ccm 0,1 n-Ammoniak anzurühren, von neuem zu zentrifugieren und ebenso einen dritten Auszug zu bereiten, abermals, falls die alkalische Reaktion verschwunden ist, unter Zusatz von einigen Kubikzentimeter Ammoniak. Die vereinigten Auszüge, etwa  $\frac{1}{2}$  Liter, enthalten 60% der Trockensubstanz der Mandeln. Ein Teil der Eiweißstoffe wird jetzt mit Essigsäure (60 ccm 0,5 n) ausgefällt und abfiltriert; der Niederschlag enthält 5–8% des Emulsins. Das Filtrat wird mit der 3–4fachen Menge Alkohol gefällt, der reine weiße Niederschlag

<sup>1</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1895, 28, 1508. — E. FISCHER u. M. BERGMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1917, 50, 1047.

<sup>2</sup> R. WEIDENHAGEN: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1929, 79, 591.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. CZÁNYI: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 117, 172.

mittels der Zentrifuge abgetrennt und mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Das Pulver wird mit wenig Wasser in der Reibschale zu einem Teige angerieben, in der 30fachen Menge Wasser gelöst, dann wird vom Ungelösten abzentrifugiert und zum zweiten Male mit Alkohol gefällt. Das Präparat ist in Wasser klar löslich.

Die Emulsinpräparate des Handels sind nach WILLSTÄTTER zwar nicht so wirksam, aber haltbarer.

Darstellung von Emulsin aus Pflaumenkernen nach B. HELFERICH<sup>1</sup>. Die zerkleinerten Kerne von *Prunus domestica* werden mit 2 Gewichtsteilen Toluolwasser angerührt, 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, abzentrifugiert, die nicht ganz klare Lösung nach mehreren Wochen mit etwa 1,5 Volumenteilen der Fermentlösung Alkohol gefällt, das gefällte Präparat abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

#### d) Galaktosidasen.

Die Spezifität der Galaktoside spaltenden Enzyme ist noch nicht genügend untersucht; man wird zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galaktosidasen zu unterscheiden haben. Das lactosespaltende Enzym, das sich vor allem in den Milchzuckerhefen und Kefirkörnern, aber auch in Schimmelpilzen wie *Aspergillus niger* findet, ist eine  $\beta$ -Galaktosidase. Es hydrolysiert außer Lactose auch  $\beta$ -Methylgalaktosid.  $\alpha$ -Galaktosidase findet sich dagegen in bitteren Mandeln, sowie in untergärer Hefe; sie spaltet Raffinose in Saccharose und Galaktose, ferner Melibiose in Galaktose und Glucose.

Zur Darstellung der  $\beta$ -Galaktosidase, der Lactase, verwenden WILLSTÄTTER und OPPENHEIMER<sup>2</sup> frische Reinkulturen von *Saccharomyces fragilis*, die mit wiederholt sterilisiertem und filtriertem Hefedokt unter Zusatz von 7–10% Lactose bei 26° weiter gezüchtet werden. 5 g der frischen Hefe werden etwa 10 Minuten mit 1 ccm Chloroform verflüssigt, dann mit 7 ccm Wasser verdünnt und vorsichtig mit 1,1 ccm 1%igem Ammoniak neutralisiert. Im Verlauf der nächsten 6 Stunden muß etwa sich noch bildende Säure wieder mit 1% Ammoniak vorsichtig neutralisiert werden. Nach 2–3 Tagen wird die Galaktosidase abfiltriert. Oder es wurde die lufttrockene Hefe ohne Zerkleinerung und ohne Toluolzusatz verarbeitet, indem 2 g getrockneter *Saccharomyces fragilis* mit 20 ccm Wasser versetzt und sorgfältig mit 1%igem Ammoniak neutralisiert wurde. Nach einem Tage wurde die Lactaselösung abzentrifugiert.

### 3. Gewinnung und Reinigung der Polyasen.

#### a) Amylasen.

Unter Amylase oder Diastase versteht man einen wahrscheinlich aus mehreren Teilenzymen zusammengesetzten Enzymkomplex, der den Abbau von Stärke und Glykogen bis zur Maltose katalysiert. Die enzymatische Verzuckerung der Stärke kommt im allgemeinen vollständig oder doch annähernd vollständig zum Stillstand, wenn etwa 75–80% der theoretisch möglichen Maltosemenge gebildet sind. Zur Erklärung dieser Erscheinung hat man meist auf den reaktionshemmenden Einfluß des gebildeten Zuckers hingewiesen. Die Lage der Verzuckerungsgrenze ist aber außerdem von der Beschaffenheit der angewandten Enzympräparate abhängig. Für die Verzuckerung der sog. Grenz-Dextrine sind nach den Befunden von H. PRINGSHEIM und Mitarbeitern sowie von R. KUHN<sup>3</sup> aktivierende Begleitstoffe, das sog. Komplement notwendig, eine Anschauung, die allerdings nicht unbestritten ist<sup>4</sup>. Außer diesem Komplement, das nur die

<sup>1</sup> B. HELFERICH: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 117, 159. — B. HELFERICH, B. P. E. SPEIDEL u. W. TOELDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 128, 99.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. TR. OPPENHEIMER: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 118, 170.

<sup>3</sup> H. PRINGSHEIM u. FUCHS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1923, 56, 1762. — H. PRINGSHEIM u. SCHMALZ: Biochem. Zeitschr. 1923, 142, 108. — H. PRINGSHEIM u. BEISER: Biochem. Zeitschr. 1924, 148, 336. — H. PRINGSHEIM: Zeitschr. angew. Chem. 1926, 39, 1454. — R. KUHN: Ann. Chem. 1925, 443, 1.

<sup>4</sup> O. HOLMBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 134, 68. — R. WEIDENHAGEN u. A. WOLF: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1930, 80, 866.

Spaltung der Grenzdextrine fördert, ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR<sup>1</sup> am amyolytischen System eine Amylo-Kinase beteiligt, deren Abtrennung und Isolierung aus Grünmalz durch Adsorption an Tonerde gelingt. Die Wirkung dieses Aktivators besteht in der Steigerung der enzymatischen Wirksamkeit; seine spezifische Wirksamkeit ist noch nicht bekannt.

Grundsätzlich verschieden von der Wirkung der Amylasekomplemente und der Amylo-Kinase ist die lange bekannte Aktivierung tierischer Amylase durch Salze. Tierische Amylasen werden durch Neutralsalze, besonders durch Chloride, aktiviert. Dialysierter Pankreassaft büßt nach BIERRY<sup>2</sup> seine diastatische Wirkung vollkommen ein.

Die Amylasen sind in der Natur sehr verbreitet. Überall, wo Stärke oder Glykogen als Reserve- oder Baustoffe Verwendung finden, darf mit dem Vorkommen von Amylasen gerechnet werden.

Die einzelnen Amylasen unterscheiden sich in ihrer sterischen Spezifität. Die sog.  $\alpha$ -Amylasen lassen aus Stärke  $\alpha$ -Maltose entstehen, die  $\beta$ -Amylasen  $\beta$ -Maltose. Zu den  $\alpha$ -Amylasen sind z. B. die Pankreasamylase und die Taka-diastase zu rechnen; die Malzamyase stellt nach E. OHLSSON<sup>3</sup> eine Mischung beider Enzyme dar. Nach Erfahrungen von E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. PURR<sup>4</sup> lassen sich diese beiden Amylasentypen durch Adsorptionsmittel fraktionieren.

**$\alpha$ ) Pankreasamylase.** Gewinnung von Enzymauszügen: Die Pankreasdrüsen des Schweines werden nach dem bei der Pankreaslipase (S. 720) beschriebenen Verfahren getrocknet und entfettet, das fein gemahlene Trockenpräparat mit etwa 87%igem Glycerin im Verhältnis 1:10 verrührt und nach eintägigem Stehen durch Faltenfilter filtriert. In diesen konzentrierten Glycerinauszügen ist das Enzym sehr beständig. Es wird hingegen äußerst unbeständig, wenn man die Glycerinlösung mit einem vielfachen Volumen Wasser verdünnt, wie es bei der Messung der amyolytischen Wirkung notwendig ist; denn die Konzentration des Enzyms ist so groß, daß um ein genaues Pipettieren zu erreichen, eine Verdünnung auf das 200–300fache erforderlich ist. Die Verdünnung ist ganz kurz vor der Anwendung zur Enzymmessung vorzunehmen. Reinigung der Pankreasamylase: WILLSTÄTTER und Mitarbeiter<sup>5</sup> isolieren die Amylase mit Hilfe der Adsorptionsmethoden, wobei sie frei von den begleitenden Pankreasenzymen, den lipatischen, ereptischen und tryptischen Enzymen erhalten wird. Das Adsorptionsverhalten der Amylase wird von den Begleitstoffen in hohem Maße beeinflusst; je reiner die Amylase, desto schwerer ist sie adsorbierbar. Als Ausgangsmaterial dient der Glycerinauszug aus Trockenpankreas. Durch zweimalige Adsorption mit Aluminiumhydroxyd aus saurer Lösung wird die Lipase zusammen mit den ereptischen Enzymen vollständig abgetrennt, sodann durch zweimalige Einwirkung von Kaolin in schwachessigsauerm, glycerinhaltigem Milieu das Trypsin. Eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades wird erreicht durch Adsorption der Amylase selbst an Tonerde aus alkoholhaltiger, neutraler Lösung und Elution des Tonerdeadsorbates mit alkalischen, glycerinhaltigen Mitteln. Durch Dialyse gegen fließendes Wasser können Elektrolyte und Glycerin entfernt werden, die Amylase büßt hierbei indessen ihre Wirkung ein. Die Ausbeute der Amylase, gemessen vor der Dialyse, beträgt

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 203, 117.

<sup>2</sup> H. BIERRY u. J. GIAJA: Compt. rend. Paris 1906, 143, 300.

<sup>3</sup> E. OHLSSON: Compt. rend. Laborat. CARLSBERG 1926, 16, 7; Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 189, 17.

<sup>4</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 203, 117. — E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. M. REICHEL: Zeitschr. physiol. Chem. im Druck.

<sup>5</sup> R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. HESSE: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 126, 143; 1925, 142, 14. — Vgl. auch E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. REICHEL: Naturwiss. 1932, 20, 254.

30–40% ; ihre Konzentration, ermittelt aus der Aktivität vor der Dialyse und dem Trockengewicht des Dialysats, ist auf etwa das 130fache von derjenigen im getrockneten Pankreas gestiegen.

Die nach WILLSTÄTTER gereinigten Pankreasamylasepräparate sind nach R. KUHN<sup>1</sup> auch frei von Maltase, was für die Untersuchung der Amylase und des Grenzabbaus der Stärke von Bedeutung ist.

β) **Leberamylase.** Zur Gewinnung von Leberamylaselösungen empfiehlt HOLMBERGH<sup>2</sup> die Extraktion von trockenem, haltbarem Leberpulver. Die gut zerkleinerte Organmasse wird entweder nach W. WIECHOWSKI und H. WIENER<sup>3</sup> möglichst schnell getrocknet, indem man sie im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid in dünner Schicht auf Glasplatten ausbreitet, oder sie wird mit Aceton und Äther entwässert. Die Extraktion der Amylase kann mit Wasser oder Glycerin erfolgen. Während für den Auszug mit Wasser (1 g Pulver auf 10 ccm) eine Extraktionsdauer von 3 Stunden hinreichend ist, ist mit Glycerin ein 24stündiges Auslaugen bei 18° erforderlich. Im Glycerinauszug aus Leberpulver ist die Amylase nicht so beständig wie in den Auszügen aus Trockenpankreas; die Aktivität sinkt schon nach 3 Tagen. Für eine präparative Reinigung ist deshalb das Leberenzym nicht geeignet. Seine Konzentration im frischen Organ beträgt auch nur etwa den viertausendsten Teil von der des Pankreas.

γ) **Pflanzliche Amylasen.** Das hauptsächlichste Ausgangsmaterial zur Gewinnung pflanzlicher Amylase sind die gekeimten Cerealien, unter diesen wieder die gekeimte Gerste, das Malz. Die höchste diastatische Kraft besitzt das ungedarrte Langmalz der Brennerei. In der ungekeimten Gerste ist die amylolytische Wirksamkeit verhältnismäßig gering; sie steigt bei der Keimung um ein vielfaches. Diese starke Erhöhung der Wirksamkeit ist nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. PURR<sup>4</sup> auf die Bildung eines spezifischen Aktivators, der Amylo-Kinase zurückzuführen.

**Darstellung der Malzamyase.** Für die Gewinnung der Amylase aus Malz ist die Tatsache von Bedeutung, daß das zerkleinerte Material das Enzym sehr leicht an Wasser abgibt.

Darstellung nach EULER und SVANBERG<sup>5</sup>. 130 g feingeriebenes Dörrmalz werden bei Zimmertemperatur 3 Tage mit 400 ccm Wasser in Gegenwart von Toluol in einer verkorkten Flasche, die öfter geschüttelt werden muß, extrahiert. Die Aufschwemmung wird durch ein Tuch gepreßt und die noch trübe Lösung zur Klarheit filtriert. Danach wird sie 40 Stunden gegen Wasser in Kollodiumsäckchen dialysiert, wobei wieder durch Toluol für Keimfreiheit gesorgt wird. Die Stabilität der gelösten Amylase ist bei Zimmertemperatur ziemlich groß; die Lösungen sind mehrere Wochen haltbar. Durch Füllen mit Aceton oder Alkohol können daraus wirksame Trockenpräparate dargestellt werden.

Eine weitgehende Reinigung der pflanzlichen Amylase wurde bis jetzt nicht erreicht. Für die Malzamyase haben H. LUERS und E. SELLNER<sup>6</sup> eine Reinigung mittels Adsorptionsmittel durchgeführt. Auch H. v. EULER<sup>7</sup> gibt dafür Vorschriften. Er fand, daß Malzamyase aus saurer Lösung von Kaolin adsorbiert wird, hingegen nicht aus neutraler oder alkalischer Lösung; durch Phosphatpuffer von  $p_H = 8$  kann das Enzym aus dem Adsorbat eluiert werden. Für die Untersuchung über den Grenzabbau der Stärke sind Amylasepräparate benötigt, die vollkommen wirkungslos gegenüber Maltose sind. H. PRINGSHEIM und Mitarbeitern<sup>8</sup> gelang die Gewinnung einer fast vollständig maltasefreien Malzamyase durch wiederholte Adsorption an Kaolin aus saurer, wäßrig-alkoholischer Lösung und Elution mit alkalischem Phosphat. Auch durch

<sup>1</sup> R. KUHN: Ann. Chem. 1925, 443, 1.

<sup>2</sup> O. HOLMBERGH: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 134, 68.

<sup>3</sup> W. WIECHOWSKI u. H. WIENER: Hofmeisters Beitr. 1907, 9, 247.

<sup>4</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 203, 117.

<sup>5</sup> H. v. EULER u. O. SVANBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 112, 193.

<sup>6</sup> H. LUERS u. E. SELLNER: Wochenschr. Brauerei 1925, 42, 97.

<sup>7</sup> H. v. EULER: Chemie der Enzyme I. Teil, 1920, S. 88.

<sup>8</sup> H. PRINGSHEIM, A. GENIN u. R. PEREWOSKY: Biochem. Zeitschr. 1925, 164, 117.



lang dauernde Dialyse und Alterung der Malzextrakte läßt sich nach PRINGSHEIM<sup>1</sup> die Maltase, wie auch die Cellobiase zum Verschwinden bringen.

Darstellung und Messung der Amylokinase<sup>2</sup>. Für die Darstellung der Amylokinase aus den wäßrigen Auszügen aus Grünmalz und für den Nachweis ihrer Wirkung ist die Abtrennung der begleitenden Amylase zunächst erforderlich. Man erreicht sie verhältnismäßig leicht durch wiederholte Behandlung der Auszüge mit Tonerde der Sorte C $\gamma$  bei  $p_H = 5$ . Durch das Adsorbens wird, wenn auch vielleicht unter erheblichen Verlusten an Aktivator, die Amylase vollständig aufgenommen, die verbleibende Adsorptionsrestlösung findet man praktisch frei von verzuckernder Wirkung.

50 ccm Grünmalzauszug, durch 24stündige Extraktion von zerquetschtem Grünmalz (Wurzelkeimlänge = 1—2 cm) mit Wasser im Verhältnis 1:5 (auf das ursprüngliche Gerstengewicht bezogen) unter Toluol und darauffolgendes Abnutschen bereitet, wurden mit 10 ccm n-Acetatpuffer von  $p_H = 5$  versetzt und mit 25 ccm Tonerdesuspension C $\gamma$  (= 500 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), darauf mit 12,5, mit 5,0 und endlich mit 2,5 ccm der Tonerde (= 250, bzw. 100, bzw. 50 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) adsorbiert. Mit 2,0 ccm der neutralisierten Adsorptionsrestlösung beobachtet man in 120 Minuten keine meßbare Verzuckerung von Amylose.

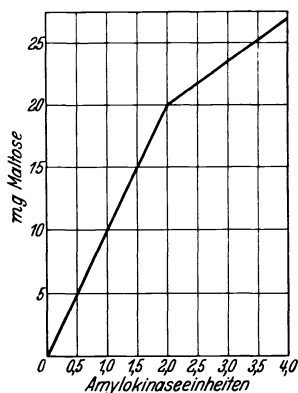


Abb. 8. Amylokinaseeinheiten und Amylasespaltung.

Zur Erkennung und zum Nachweis des Aktivators kann die Beschleunigung der Amyloseverzuckerung durch Gerstenamylase dienen, die der Aktivator bewirkt: z. B. spalten 0,5 ccm wäßriger Gerstenauszug (1:5) 140 mg Amylose in 30 Minuten bei  $p_H = 5,1$  und 370 zu 27% nach Zusatz von 8 ccm Aktivatorlösung aber zu 87%. Eindeutiger wird die Aktivierungsleistung der Amylokinase an der Pankreasamylase gemessen; diese wird zwar beim eigenen Wirkungsoptimum nur geringfügig gesteigert, sehr bedeutend aber bei mäßig saurer Reaktion, beim Wirkungsoptimum der Malzamylose.

Die Messung des Aktivators beruht auf den Beziehungen zwischen Aktivatormenge und Aktivierungsleistung gegenüber dem hundertsten Teil einer Pankreasamylaseeinheit, 0,01 Amylaseeinheit und bei  $p_H = 5,1$ ; diese findet man bei zunehmender Aktivatormenge zunächst proportional, während weiterhin, bei Anwendung größerer Kinasemengen, die relative Aktivierungsleistung infolge des Enzyms mit den Aktivator abnimmt. Abb. 8 veranschaulicht die beobachtete Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Kinasemenge.

Als vorläufiges Maß für die Menge des Aktivators ist die Amylokinaseeinheit definiert als diejenige Aktivatormenge, welche 0,01 Pankreasamylaseeinheiten bei Anwendung von 140 mg Amylose, 10 ccm 0,1 Mol Citratpuffer von  $p_H = 5,1$ , 1,0 ccm 0,2 n-Natriumchloridlösung in einem Gesamtvolumen von 50 ccm, in 20 Minuten bei 37° eine Aktivierung entsprechend einer Maltosebildung von 10 mg erteilt.

Die Messung des gebildeten Aldehydzuckers erfolgt nach der Methode von WILLSTÄTTER und SCHUDEL (S. 726).

## b) Cellulase und Lichenase.

Der enzymatische Abbau von Cellulose und von Lichenin, das im Pflanzenreich außerordentlich weitverbreitet ist und chemisch offenbar der Cellulose nahesteht, wird durch zwei Enzyme, die Cellulase und die Lichenase,

<sup>1</sup> H. PRINGSHEIM u. J. LEIBOWITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 131, 263.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 203, 117.

bewirkt. Es muß heute noch für zweifelhaft gelten, ob die Wirkung auf die beiden Substrate tatsächlich zwei verschiedenen Enzymen zuzuschreiben ist.

In der Natur findet in ausgedehntem Maße eine Lösung und Vergärung der Cellulose durch Mikroorganismen statt; demgemäß sind Bakterien die Hauptträger der Cellulase. Denitrifizierende Bakterien, Methangärungsbakterien und besonders die thermophilen Bakterien sind cellulaseführende Mikroorganismen. Über die Züchtung dieser Bakterienarten und die Freilegung des Enzyms sei auf die Arbeiten von H. PRINGSHEIM und Mitarbeitern<sup>1</sup> verwiesen.

Das licheninhydrolysierende Ferment ist eingehend studiert worden von KARRER und Mitarbeitern<sup>2</sup> im Saft oder dem wäßrigen Extrakt der Weinberg-schnecke. Dort kommt es zusammen mit zahlreichen anderen Enzymen vor. Die erste Reinigung wird durch Dialyse erreicht; nach 2—3 Tagen sind aus der Lösung Invertin, Lipase, Inulase und Maltase verschwunden, man findet nur noch Lichenase mit der zu ihrem Komplex gehörenden Cellobiase, sowie Gentiobiase. Durch Fällung der dialysierten Lösungen mit Aceton oder Alkohol, Absaugen der Niederschläge und Auswaschen mit Äther kann man die Lichenase in Trockenpräparate überführen. Die Trennung der Lichenase von Cellobiase gelingt teilweise schon durch Alterung der Enzymlösung, besser durch fraktionierte Adsorption. Lichenase und Cellulase findet sich nach PRINGSHEIM und SEIFERT<sup>3</sup> auch in wäßrigen Malzauszügen.

Bei allen Arbeiten mit Lichenase und auch mit Cellulase ist der große Einfluß des physikalischen Zustandes des Substrates auf seine enzymatische Spaltbarkeit zu beachten. So werden z. B. unter gleichen Reaktionsbedingungen native Cellulosen (Baumwolle und Filtrierpapier) nur sehr wenig angegriffen, während folgende denaturierte Cellulosen mit zunehmender Leichtigkeit gespalten werden: Mercerisierte Cellulose, regenerierte Kupferammin- und Xanthogenatcellulose, alkalilösliche Cellulosen, die durch Verseifung bestimmter Acetylcellulosen oder durch Umfällen aus rauchender Salzsäure erhalten werden. Mit sehr verschiedener Leichtigkeit werden verschiedene technische Kupfer- und Viscoseseiden gespalten, wobei sich als entscheidender Faktor die Oberflächenstruktur der Fäden erwies; die Enzymfestigkeit ist um so höher, je stärker gelappt und gekerbt die Umrisse der Fadenquerschnitte sind.

Man mißt die Enzymwirkung mittels reduktimetrischen Methoden, z. B. nach BERTRAND (S. 726).

### c) Pektinspaltende Enzyme.

Als Pektinstoffe bezeichnet man eine in der Pflanzenwelt weitverbreitete Gruppe von Polysacchariden, die kolloidaler Natur, in Wasser stark quellbar sind und schleimige, leimartige Suspensionen oder Lösungen geben, aus denen sie sich unter bestimmten Bedingungen in Form von gallerten- oder gallertartigen Niederschlägen abscheiden. Die chemische Natur der Pektinstoffe ist von F. EHRLICH<sup>4</sup> weitgehend aufgeklärt worden. Pektine setzen sich zusammen aus einer hochmolekularen Estersäure, der Pektinsäure, und einem Pentosan, dem Araban. Schon durch heißes Wasser wird das Pektin in diese beiden Komponenten zerlegt. Das typische Kernstück der Pektinsäure ist eine Verbindung,

<sup>1</sup> H. PRINGSHEIM: Zeitschr. physiol. Chem. 1912, 78, 266. — H. PRINGSHEIM: Die Polysaccharide 1923, S. 769.

<sup>2</sup> P. KARRER, M. STAUB, A. WEINHAGEN u. B. JOOS: Helv. chim. Acta 1924, 7, 144. — P. KARRER u. M. STAUB: Helv. chim. Acta 1924, 7, 916. — P. KARRER, B. JOOS u. M. STAUB: Helv. chim. Acta 1923, 6, 800.

<sup>3</sup> H. PRINGSHEIM u. K. SEIFERT: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 131, 262.

<sup>4</sup> F. EHRLICH u. v. SOMMERFELD: Biochem. Zeitschr. 1926, 168, 263. — F. EHRLICH u. F. SCHUBERT: Biochem. Zeitschr. 1926, 169, 13. — F. EHRLICH: Zeitschr. angew. Chem. 1927, 1305.

in der vier Galakturonsäuren in ringförmiger Bindung aneinandergelagert sind, die Tetra-galakturonsäure. Ihr ist die charakteristische Art der Gelbildung zuzuschreiben.

Die Darstellung der Pektine gelingt aus den meisten pflanzlichen Materialien, am besten aus getrockneten, ausgelaugten Zuckerrübenschnitzeln, die zu einem hohen Prozentsatz aus Pektinstoffen bestehen.

Das in gekeimter Gerste, in Takadiastase, sowie in Schimmelpilzen beobachtete Ferment oder der Fermentkomplex Pektinase baut die Pektinstoffe zu wasserlöslichen, reduzierenden Stoffe ab. Nach Einwirkung der Pektinase ruft Pektase (s. unten) keine Gelierung mehr hervor; es ist deshalb zu folgern, daß Pektinase die Pektine über die Zwischenstufen, wie die Tetragalakturonsäure hinweg bis zu den letzten Endprodukten, der Galakturonsäure, der Galaktose, der Essigsäure und dem Methylalkohol zerlegt.

Die Pektinasewirkung von Auszügen aus Grünmalz, bzw. von Takadiastasepräparaten auf Pektinstoffe wird verfolgt durch Ermittlung des Zuwachses an reduzierenden und sauren Gruppen während der Enzymeinwirkung.

Zum Beispiel ergibt nach F. EHRlich<sup>1</sup> die Einwirkung von 1 g Diastase auf 10 g Rübenmark, die in 200 ccm Wasser suspendiert sind, in 6 Tagen einen Zuwachs reduzierender Gruppen, entsprechend 0,6 g Glucose und einen Aciditätszuwachs entsprechend 12 ccm 0,1 n-Natronlauge.

Bei der Einwirkung der Pektase auf gelöste Pektinstoffe treten mehrere Spaltstücke auf, unter anderen die Tetragalakturonsäure, die sich mit vorhandenen Kalksalzen zu wasserunlöslichem tetragalakturonsaurem Calcium umsetzt, das sich in Gallertform abscheidet und aus dem im wesentlichen die durch die Fermentwirkung gebildete Geleemasse besteht<sup>2</sup>. Unter den Einwirkungsprodukten der Pektase läßt sich außerdem nach v. FELLEBERG<sup>3</sup> Methylalkohol nachweisen.

Die Pektase ist ein in der Pflanzenwelt weit verbreitetes Enzym<sup>4</sup>. Es findet sich in jungen Blättern grüner Pflanzen, in jungen Mohrrüben und in den meisten Obstsaften stark angereichert. Wirksame Präparate erhält man nach BERTRAND und MALLÈVRE<sup>4</sup> durch Alkoholfällung aus Klee- und Luzerneblättern. Für das Eintreten der Gelbildung ist es erforderlich, daß genügende Mengen von Kalksalzen in der Lösung vorhanden sind. Das Ferment wirkt in neutralen Medien am günstigsten und wird gewöhnlich durch Gegenwart von Säure geschädigt.

Zum Nachweis des Pektasegehaltes von Pflanzen wird der Preßsaft aus ihnen mit dem gleichen Volumen 2%iger Pektinsäuresalzlösung vermischt und die Zeit bis zum Eintritt der Gelbildung festgestellt, was als Maßstab für den Gehalt der Pflanzensäfte an Pektase dienen kann.

### C. Proteasen.

Die Aufgabe der proteolytischen Enzyme besteht in dem Abbau der Proteine zu ihren einfachsten Bausteinen, den Aminosäuren. Für die Proteolyse steht ein ganzes System von Enzymen zur Verfügung, deren Wirkungsweise, soweit bis heute bekannt, indes nur in der Sprengung von Säureamidbindungen, der Bindung  $-\text{NH}-\text{CO}-$ , unter Bildung freier Amino- und Carboxylgruppen besteht. Über den Wirkungsmechanismus und die Einteilung der proteolytischen Enzyme wurde schon Bd. I, S. 713 eingehend berichtet. Danach wird man heute innerhalb der Gruppe proteolytischer Enzyme zweckmäßig unterscheiden zwischen dem proteolytischen System des Verdauungstraktes, das sich

<sup>1</sup> F. EHRlich: Pektinase und Pektase in Methodik der Fermente, herausgeg. von C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN. Leipzig 1928.

<sup>2</sup> F. EHRlich: Chem.-Ztg. 1917, 41, 197.

<sup>3</sup> v. FELLEBERG: Biochem. Zeitschr. 1918, 85, 118.

<sup>4</sup> G. BERTRAND u. A. MALLÈVRE: Compt. rend. Paris 1895, 121, 726.

zusammensetzt aus den ereptischen Enzymen, den tryptischen Enzymen und dem Pepsin, und dem proteolytischen System der Organe und Gewebe von Tier und Pflanze, das sich aus den ereptischen Enzymen und aus den katheptischen Enzymen zusammensetzt. Unter den ereptischen Enzymen versteht man das natürliche Gemisch von Dipeptidase, Aminopolypeptidase und meist auch von der überall in geringen Mengen vorkommenden Prolinase, unter tryptischen Enzymen ist das natürliche Gemisch einer Carboxypolypeptidase mit der Proteinase, dem sog. Trypsin zu verstehen; die katheptischen Enzyme zuletzt sind ein Gemenge von einer Carboxypolypeptidase und einer Proteinase dem sog. Kathepsin.

Man wird, abgesehen von dem reichlichen Vorkommen im tierischen Verdauungstrakt, proteolytische Enzyme in den meisten Organen und Geweben der Tier- und Pflanzenwelt antreffen, insbesondere da, wo ein großer Stickstoff-Stoffwechsel zu erwarten ist, also in den Organen wie Niere, Milz, Leber, im Blut, besonders in den weißen Blutkörperchen, ferner in den Pflanzensamen, Früchten, und in schnell wachsenden Pilzen und Bakterien.

## 1. Bestimmungsmethoden von proteolytischen Enzymen.

### a) Allgemeine Methodik.

Die Wirkung proteolytischer Enzyme mißt man an der Zunahme freier Carboxyl- bzw. freier Aminogruppen, die bei der Proteolyse stattfindet. Für die Ermittlung der bei der Proteolyse freigelegten Carboxyle stehen zwei exakte Verfahren zur Verfügung; es sind dies die Formaldehydtitration nach S. P. L. SÖRENSEN<sup>1</sup> und die alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden in alkoholischer Lösung nach R. WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>2</sup>. Die Messung der freien Aminogruppe erfolgt nach dem gasanalytischen Verfahren nach D. D. VAN SLYKE<sup>3</sup>, das die Menge der freien Aminogruppen auf Grund ihrer Reaktion mit salpetriger Säure, die zur Bildung von Stickstoff führt, volumetrisch zu analysieren erlaubt; sie kann auch mittels acidimetrischer Titration in acetonthaltiger Lösung nach LINDERSTRÖM-LANG<sup>4</sup> ausgeführt werden.

Gegenüber diesen allgemein anwendbaren Methoden treten ältere Methoden, die sich z. B. auf die Auflösung unlöslicher Substratmengen oder auf die Eiweißfällung mit Eiweißfällungsmitteln nach der Proteolyse beziehen, an Wichtigkeit in den Hintergrund. Ebenso kommen zur Enzymmessung Methoden, die sich der Änderung im optischen Verhalten oder der Viscositätsänderung bedienen, nur in Ausnahmefällen in Betracht.

### Messung der Proteolyse durch Bestimmung der verminderten Substratmenge.

Die älteren Methoden zur Bestimmung der Proteolyse bedienen sich vorzugsweise der Bestimmung des unveränderten Substrates nach Einwirkung des Enzyms. Nur zur Lösung bestimmter Probleme wird man sich heute dieser Art der Bestimmung bedienen, die ungenauer und meist auch komplizierter auszuführen ist als die oben erwähnten, die auf der Messung freigesetzter Reaktionsgruppen beruht. Es sei deshalb nur ein kurzer Hinweis auf die Methodik hier eingefügt.

Man kann die Meßmethoden, bei denen die Abnahme des ursprünglichen Substrates als Maßstab der Enzymwirkung dient, in zwei Gruppen einteilen. Bei der ersten wird die Auflösung eines unlöslichen Substrates direkt, z. B. gravimetrisch gemessen, bei der zweiten arbeitet man mit löslichen Substraten und führt nach Beendigung der Spaltung das unveränderte Substrat durch Erhitzen, Veränderung des  $p_H$  oder durch Zusatz von Fällungsmitteln in unlösliche Form über, während die Abbauprodukte in Lösung bleiben, wenigstens

<sup>1</sup> S. P. L. SÖRENSEN: Biochem. Zeitschr. 1908, 7, 45.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1921, 54, 2988.

<sup>3</sup> D. D. VAN SLYKE: Journ. Biol. Chem. 1911, 9, 185.

<sup>4</sup> K. LINDERSTRÖM-LANG: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 173, 32.

soweit sie über einen gewissen, von der Art des Fällungsmittels abhängigen Punkt hinaus abgebaut sind.

So besteht eine wichtige ältere Bestimmungsweise des Trypsins von S. METT in der Verfolgung der Auflösung koagulierten Proteins. In der neueren Zeit beschreiben R. WILLSTÄTTER und Mitarbeiter<sup>1</sup> die Messung der Fibrinauflösung durch Papain. Sie beruht auf der gravimetrischen Bestimmung des ungelösten Anteils. Die Verwendung ungelösten Substrates für quantitative Messungen birgt gewisse Fehlerquellen in sich, die möglichst einzuschränken sind. Das Substrat soll sich in einen äußerst feinen, reproduzierbaren Verteilungszustand befinden; durch eine mechanische Schüttelungsvorrichtung ist für eine gleichmäßige Durchmischung des Versuchsansatzes zu sorgen. Zweckmäßig wendet man das Substrat in großem Überschuß an und legt der Messung nur die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse zugrunde.

Für die zweite Art, die Bestimmung des unveränderten Substrates zur Messung der Proteolyse heranzuziehen, eignen sich besonders solche Eiweißkörper, die schon durch Einstellung einer bestimmten Acidität vollständig niedergeschlagen werden können. So kann man nach R. E. GROSS<sup>2</sup> zur Pepsinbestimmung saure oder zur Trypsinbestimmung alkalische Caseinlösung nach erfolgter Verdauung auf die Reaktion des isoelektrischen Punktes ( $p_H = 4,8$ ) einstellen und die Menge des ausfallenden und unveränderten oder die des in Lösung bleibenden Anteils nach einer geeigneten Methode, z. B. durch Wägung oder durch Stickstoffbestimmung bestimmen.

Eine von FULD<sup>3</sup> angegebene, von EGE<sup>4</sup> wesentlich verbesserte Messungsmethode für Pepsin verwendet kristallisiertes Edestin als Substrat. Die sauren Lösungen dieses Proteins werden durch Neutralisation oder durch Zusatz von Neutralsalz gefällt, während die Abbauprodukte in Lösung bleiben. EGE bestimmt diejenige Menge von Natriumchlorid- oder Ammonsulfatlösung, welche erforderlich ist, um in der verdauten Versuchslösung einen bestimmten Trübungsgrad zu erzeugen. Die erforderliche Salzmenge ist um so größer, je mehr die Pepsinwirkung fortgeschritten ist.

Eine bei Anwendung aller Eiweißkörper brauchbare Methode ergibt fernerhin die Verwendung der gewöhnlichen Eiweißfällungsmittel. Man fällt das unveränderte Eiweiß zusammen mit höheren Abbauprodukten, z. B. Gerbsäure (SÖRENSEN<sup>5</sup>) und bestimmt den Stickstoff im Filtrat nach KJELDAHL.

#### Messung der Proteolyse durch Bestimmung physikalisch-chemischer Veränderung des Substrates.

Polarimetrische Methode. Das Drehungsvermögen von Eiweißstoffen, Peptiden und Aminosäuren ist eine charakteristische Konstante. Die Veränderung des Drehungsvermögens bei der Proteolyse kann unter Umständen als Maß für die Größe der Proteolyse dienen. Über die Hydrolyse von Proteinen, die strukturchemisch nicht aufgeklärt sind und deren Zusammensetzung viel zu kompliziert ist, kann mit Hilfe der optischen Methode kaum ein quantitativer Schluß gezogen werden; zum qualitativen Nachweis der Proteolyse und zur Lösung bestimmter Fragen in Kombination mit anderen Meßmethoden, kann jedoch das polarimetrische Verfahren von Bedeutung sein. Zur Verfolgung der enzymatischen Peptid-Spaltung ist die optische Methode von E. ÄBDERHALDEN und Mitarbeitern<sup>6</sup> des öfteren mit Erfolg angewandt worden. Bei der Spaltung optisch aktiver Dipeptide läßt sich aus jedem einzelnen während der Hydrolyse beobachteten Drehwert die Menge des gespaltenen Peptids ohne Schwierigkeit nach folgender Beziehung berechnen:

$$\alpha = (1 - m) \cdot \alpha_0 + m \cdot \alpha_E,$$

worin  $\alpha$  die jeweils beobachtete Drehung,  $\alpha_0$  die beobachtete Anfangsdrehung,  $\alpha_E$  die Enddrehung nach vollkommener Spaltung und  $m$  den umgesetzten Anteil des Substrates bedeutet.

$$m = \frac{\alpha - \alpha_0}{\alpha_E - \alpha_0}.$$

Bei der Spaltung optisch aktiver Polypeptide ist die Berechnung des Spaltungsgrades durch Bestimmung des Drehvermögens allein nicht mehr möglich. Indessen kann hier das optische Verhalten in vielen Fällen über den Mechanismus der Spaltung, den Angriffspunkt des Enzyms Auskunft geben.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER, W. GRASSMANN u. O. AMBROS: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, **152**, 164.

<sup>2</sup> R. E. GROSS: Berlin. klin. Wochenschr. 1908, 643.

<sup>3</sup> E. FULD u. L. A. LEVISON: Biochem. Zeitschr. 1907, **6**, 473.

<sup>4</sup> R. EGE: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, **127**, 125; 1925, **143**, 159; Biochem. Zeitschr. 1924, **145**, 66.

<sup>5</sup> S. P. L. SÖRENSEN: Biochem. Zeitschr. 1909, **21**, 131 u. zwar 288.

<sup>6</sup> E. ÄBDERHALDEN u. A. KOELKER: Zeitschr. physiol. Chem. 1907, **51**, 294; **54**, 363.

Messung der Leitfähigkeit. Die Messung der Leitfähigkeit kann ebenfalls zur Bestimmung der Proteolyse herangezogen werden. Durch das Auftreten niederer und ionisierter Abbauprodukte kommt im allgemeinen eine Erhöhung der Leitfähigkeit zustande; aber nur in den Fällen, in denen durch die Reaktionsprodukte keine Wasserstoff- oder Hydroxylionen gebunden werden. Wird die Messung in stärker saurer oder alkalischer Lösung vorgenommen, so tritt dieser Fall ein; die Reaktion wird nach der Seite des Neutralpunktes zu verschoben, die Leitfähigkeit sinkt. Die gemessene Leitfähigkeitsänderung gestattet zwar keine chemische Auswertung, doch liefert sie innerhalb gewisser Grenzen exakte Werte für eine Enzymbestimmung.

J. H. NORTHROP<sup>1</sup> hat eine quantitative Bestimmung des Trypsins auf Grund der Leitfähigkeitsänderung bei der tryptischen Hydrolyse ausgearbeitet. Für die Ausführung der Bestimmung sei auf die Originalarbeit verwiesen.

Messung der Viscosität. Mit der Proteolyse ist zugleich eine starke Abnahme der Viscosität der Eiweißlösung verbunden. Diese Änderung der inneren Reibung von Proteinlösungen kann zur Messung proteolytischer Vorgänge herangezogen werden. Man verwendet zweckmäßig Substrate mit hoher Viscosität, meist Gelatine. Die Viscosität der Gelatine ist ziemlich groß, aber stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Zur Gewinnung einwandfreier Ergebnisse ist es daher notwendig, die Messung bei definierter Acidität auszuführen. Von NORTHROP<sup>2</sup> stammt eine Methode zur Bestimmung des Trypsins, die sich auf die Viscositätsänderung einer Gelatinelösung gründet. Man verwendet dabei eine 3%ige Gelatinelösung bei 30°, die durch 0,1 n-Phosphatpuffer auf  $p_H = 7,4$  eingestellt ist. Die Messung wird mit 5 ccm Lösung in einem gewöhnlichen, geraden Ausflußviscosimeter nach Wo. OSWALD ausgeführt. Zunächst wird die Viscosität der unveränderten Gelatine gemessen. Dann überläßt man eine Probe der Gelatine der Trypsinwirkung solange, bis die Formaldehydtitration keinen Fortschritt der Reaktion erkennen läßt und bestimmt ihre Viscosität von neuem. In den Versuchen selbst wird nun gemessen, welche Zeit bei Anwendung einer bestimmten Trypsinmenge erforderlich ist, bis die Viscositätsabnahme 20% der dem völligen Abbau entsprechenden Änderung beträgt. Der reziproke Wert dieser Zeit gilt als Maß der vorhandenen Enzymmenge.

Auch zur Pepsinbestimmung wurde die Messung der Viscosität vielfach herangezogen, so von E. WALDSCHMIDT-LEITZ und E. SIMONS<sup>3</sup>.

### b) Spezielle Vorschriften zur Bestimmung der proteolytischen Enzyme.

Die folgende Zusammenstellung von Vorschriften zur Bestimmung proteolytischer Enzyme macht keinen Anspruch auf vollständige Beschreibung aller in der Literatur genannten Methoden. Es konnte gewöhnlich nur eine, die gebräuchlichste und allgemein anwendbarste Vorschrift zur Bestimmung des jeweiligen Enzyms aufgenommen werden. Die Literatur über andere Bestimmungsmethoden ist angeführt.

#### α) Messung der ereptischen Enzyme.

Dipeptidase des Verdauungstraktes. Die Wirkung des dipeptidspaltenden Enzyms mißt man an der Spaltung von d, l-Leucylglycin<sup>4</sup>. Man verfolgt die Spaltung des Peptids zweckmäßig durch Titration in alkoholischer Lösung. Die Spaltung, die sowohl für das Darm- als auch für das Pankreasenzym dem monomolekularen Zeitgesetz folgt, ist bei optimalen  $p_H = 8,0$  bei konstanter Temperatur von 30° und in einer geeigneten, der Enzymmenge angepaßten Zeit vorzunehmen.

Ausführung der Bestimmung. Zum Versuche ist eine Leucyl-glycinlösung nötig. Man bereitet sie, indem man 3,764 g Leucylglycin in 40 ccm Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer (Normallösungen im Verhältnis 1:1 gemischt) und etwas Wasser durch gelindes Erwärmen löst; zu der Lösung werden 5 ccm n-Essigsäure zugegeben; hierauf wird auf 100 ccm aufgefüllt. 5 ccm dieser Lösung enthalten dann 0,1882 g Leucylglycin = 0,001 Mol. Das  $p_H$  dieser Lösung soll 8,0 sein.

<sup>1</sup> J. H. NORTHROP: Journ. of gen. Physiol. 1921, 4, 227.

<sup>2</sup> J. H. NORTHROP u. R. S. HUSSEY: Journ. of gen. Physiol. 1923, 5, 353.

<sup>3</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. E. SIMONS: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 156, 114.

<sup>4</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. SCHÄFFNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 151, 31. — E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. K. BALLS u. J. WALDSCHMIDT-GRASER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, 62, 956.

5 ccm Leucylglycinlösung werden mit der geeigneten Menge Enzymlösung (z. B. 5 ccm einer Glycerinsuspension von Darmschleimhaut 1:10 verdünnt (s. S. 761) versetzt; das  $p_H$  des Verdauungsgemisches soll 8,0 sein, was ohne weiteres der Fall ist, wenn neutrale, ungepufferte Lösungen zur Anwendung kommen; nötigenfalls ist die Enzymlösung durch Zugabe von verdünntem Ammoniak auf  $p_H = 8,0$  zu bringen. Eine Probe wird sofort, eine andere nach Ablauf einer der Enzymmenge angepaßten Zeit (z. B. 1 Stunde), während der die Probe im Thermostaten bei  $30^{\circ}$  steht, titriert. Die Titration wird in 90%iger alkoholischer Lösung mit 0,2 n-Kalilauge unter Zugabe von 2 ccm 0,5%iger Thymolphthaleinlösung ausgeführt.

Als Maß für die Enzymmenge dient die Konstante der monomolekularen Reaktion:

$$K = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x},$$

worin  $t$  in Minuten, und  $a$ , die Anfangskonzentration des Substrates, und  $x$ , die gemessene Menge umgesetzten Substrates, z. B. in Kubikzentimeter 0,2 n ausgedrückt wird. Entsprechend der angewandten Substratmenge (0,001 Mol) ist dann  $a = 5$ .

Die Messung soll nicht über 35% der Spaltung des Peptids ausgedehnt werden, da sich für höhere Spaltungsgrade der angewandte Puffer als unzureichend erweist und dann der Reaktionsverlauf nicht mehr dem monomolekularen Zeitgesetz folgt. Bei der Berechnung der prozentualen Spaltung ist zu beobachten, daß nur die eine Komponente des racemischen Substrates dem enzymatischen Angriff unterliegt, also die maximal mögliche Spaltung 50% beträgt. Die Enzymmenge ist für eine Bestimmung so zu wählen, daß die gemessene Reaktionskonstante zwischen 0,005—0,0005 liegt. Als Dipeptidase-Einheit wird dann das Tausendfache derjenigen Enzymmenge bezeichnet, für welche sich unter den angegebenen Bedingungen die Reaktionskonstante 0,001 ergibt. Als Maß für die enzymatische Konzentration gilt der Dipeptidase-Wert, das ist die Anzahl Enzymeinheiten in 1 g des getrockneten Präparates.

Dipeptidase der tierischen Organe und Gewebe. Die Bedingungen der Bestimmung der dipeptidspaltenden Enzyme der Organe und Gewebe sind ähnliche wie die für das Darm- und Pankreasenzym angegebenen. Jedoch unterscheidet sich der Reaktionsverlauf der Peptidspaltung beispielsweise durch das Milz- oder Leberenzym in bemerkenswerter Weise von dem für Darm und Pankreas beobachteten<sup>1</sup>. Für die Wirkung des Milz- und Leberenzyms gilt nämlich bis zu einer Hydrolyse von 40% Proportionalität zwischen Umsatz und Zeit; der Reaktionsverlauf ist linear.

Ausführung der Bestimmung. Zu der Lösung von 0,1882 g d,l-Leucylglycin in 5,0 ccm 0,2 n-Phosphatpuffer (9 Teile sekundär, 1 Teil primär) fügt man die zu bestimmende Enzymlösung hinzu, stellt darauf durch Zugabe von n-Ammoniak auf  $p_H = 8,0$  ein und füllt mit Glycerin bzw. mit Wasser zu einer konstanten Glycerinkonzentration von 35% auf 10,0 ccm auf. Nach Ablauf der Bestimmungszeit unterbricht man die Enzymwirkung durch Eintragen in eine Mischung von 85 ccm Methylalkohol und 5 ccm Wasser (vgl. S. 747) und ermittelt die Acidität durch Titration mit 90%iger alkoholischer 0,2 n-Lauge nach Zusatz von 2,0 ccm 0,5%iger Thymolphthaleinlösung. Zu jeder Analyse ist eine Leerbestimmung auszuführen, deren Acidität von der des Hauptversuches in Abzug zu bringen ist. Die Enzymmenge ist zweckmäßig so zu wählen, daß der gefundene Aciditätszuwachs einem Alkaliverbrauch von 0,50—1,50 ccm 0,2 n-Lauge entspricht, also einer Hydrolyse des Peptids von 10—30%.

Aus der ermittelten Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz leiten E. WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeiter eine Einheit für Organ-Dipeptidase vorläufiger Natur ab; danach ist eine Dipeptidase-Einheit gleich derjenigen Enzymmenge, für die sich unter den angegebenen Bedingungen der Quotient aus Umsatz (in Kubikzentimeter 0,2 n-Lauge) und Zeit (in Minuten) = 1,0 ergibt. Es ist also:

$$\text{Dipeptidase-Einheit für Organe} = \frac{\text{Aciditätszuwachs ccm 0,2 n}}{\text{Zeit (Minuten)}}.$$

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. W. DEUTSCH: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 167, 285. — E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. SCHÄFFNER, J. J. BEK u. E. BLUM: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 17.

**Dipeptidase der Hefe.** Das dipeptidspaltende Hefeenzym wird nach R. WILLSTÄTTER und W. GRASSMANN<sup>1</sup> an seiner Wirkung auf d, l-Leucylglycin bei einer Wasserstoffzahl von 7,8 gemessen. Bei geringer Enzymkonzentration entspricht der Reaktionsverlauf annähernd dem Gesetz der monomolekularen Reaktion, während bei größeren Enzymmengen die Abweichungen bedeutend sind. Als Einheit der Hefe-Dipeptidase wird diejenige Enzymmenge definiert, die das in 0,225 g d, l-Leucylglycin enthaltene l-Peptid unter den unten angegebenen Bedingungen in 1 Stunde bei 40° zur Hälfte spaltet.

**Ausführung der Bestimmung.** 0,225 g Leucylglycin durch Zugabe von Ammoniak gelöst und auf p<sub>H</sub> = 7,8 gebracht, wird mit 1 ccm m/3 Primärphosphat-Ammoniak-Mischung von p<sub>H</sub> = 7,8 und der zu messenden Enzymlösung (z. B. 1 ccm Hefeautolysat s. S. 774) versetzt. Das Gesamtvolumen wird auf 10 ccm aufgefüllt; die Einwirkung findet bei 40° statt. Eine Probe wird sofort, eine andere nach Ablauf von 1 Stunde der alkoholischen Titration mit 0,2 n-Kalilauge unterzogen; die Differenz zwischen beiden Proben ergibt den Aciditätszuwachs. Aus der in Abb. 9 abgebildeten Kurve kann die Enzymmenge in Einheiten abgelesen werden.

**Aminopolypeptidase des Verdauungstraktes.** Zur Messung der Aminopolypeptidasewirkung dient die Hydrolyse eines Tripeptides, des d, l-Leucyl-glycylglycin; sie wird verfolgt durch Titration des Aciditätszuwachses in alkoholischer Lösung<sup>2</sup>. Die Bestimmung wird ausgeführt bei optimalem p<sub>H</sub> = 8,0 und bei einer Temperatur von 30°.

**Ausführung der Bestimmung.** Zum Versuch ist eine Leucyldiglycinlösung nötig. Man bereitet sie, indem man 4,90 g Leucyldiglycin in 40 ccm Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer (Normallösungen im Verhältnis 1:1 gemischt) und etwas Wasser löst; zu der Lösung werden 5 ccm n-Essigsäure zugegeben; hierauf wird auf 100 ccm aufgefüllt, 5 ccm dieser Lösung enthalten dann 0,245 g Leucyldiglycin = 0,001 Mol.

5 ccm Leucyldiglycinlösung werden mit der geeigneten Menge Enzymlösung versetzt, z. B. mit 5 ccm einer Glycerinsuspension von Darmschleimhaut 1:10 verdünnt (s. S. 774); das p<sub>H</sub> des Verdauungsgemisches soll = 8,0 sein. Eine Probe wird sofort, eine andere nach Ablauf einer der Enzymmenge angepaßten Zeit (z. B. 1 Stunde), während der die Probe im Thermostaten bei 30° steht, in alkoholischer Lösung mit 0,2 n-Kalilauge titriert.

Der Reaktionsverlauf der Peptidhydrolyse durch die Aminopolypeptidase aus Darmschleimhaut ist annähernd linear, d. h. es herrscht innerhalb gewisser Grenzen Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz. Für das Pankreasenzym gelten die nämlichen Beziehungen. Aus diesen Beziehungen leitet sich das Maß für das Enzym ab. Als Einheit der Aminopolypeptidase bezeichnet man das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich unter den Bedingungen der Bestimmung der Quotient aus Umsatz und Reaktionszeit zu 0,001 ergibt.

$$\text{Amino-Polypeptidase-Einheit} = \frac{\text{ccm } 0,2 \text{ n-COOH}}{\text{Reaktionszeit in Min.}}$$

Die Bestimmung der Polypeptidase wird durch die Gegenwart von Dipeptidase, z. B. in den Rohauszügen aus Darmschleimhaut, beeinträchtigt, ihre Menge wird zu hoch gefunden werden; denn bei der Polypeptidasewirkung gebildete Dipeptide werden durch das dipeptidspaltende Enzym weiter zerlegt. Eine exakte Erfassung der Polypeptidmenge ist daher, solange man kein spezifisches Substrat zur Verfügung hat, dessen Reaktionsprodukte der Einwirkung der Dipeptidase nicht mehr unterliegen, erst nach Abtrennung der Dipeptidase von der Polypeptidase möglich.

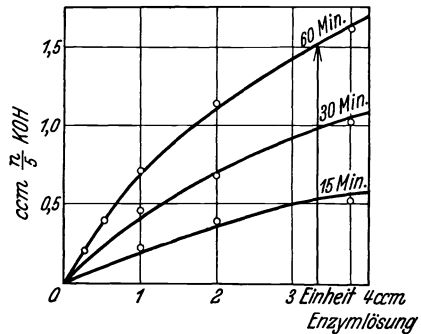


Abb. 9. Hefe-Dipeptidase-Einheiten und Umsatz.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. GRASSMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 153, 250. — W. GRASSMANN u. W. HAAG: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 167, 188.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. K. BALLS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 1203.



Aminopolyptidase der tierischen Organe und Gewebe. Die Bestimmung schließt sich ganz an die für das Darm- und Pankreasenzym gegebenen Bedingungen an. Der Reaktionsverlauf der Peptidhydrolyse ist auch hier linear; die Definition der Enzymeinheit ist daher nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern<sup>1</sup> für das Leber- und Milzenzym die nämliche.

Amino-Polyptidase der Hefe. Der Bestimmung der Hefepolyptidase nach W. GRASSMANN und H. DYCKERHOFF<sup>2</sup> liegt die Hydrolyse von d,l-Leucyl-glycyl-glycin zu Grunde. Man mißt die Einwirkung des Enzyms auf 49 mg des Peptids, in einem Volumen von 2 ccm bei 40° und  $p_H = 7,0$  und zwar in Gegenwart von Phosphat- und Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer. Die Ableitung der Polyptidase-Einheit erfolgt auf Grund der in Abb. 10 wiedergegebenen empirischen Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz bei einer Spaltungszeit von 1 Stunde. Als Einheit der Polyptidase aus Hefe wird das Fünffache derjenigen Enzymmenge bezeichnet, die unter den Bedingungen des Versuchs in einer Stunde

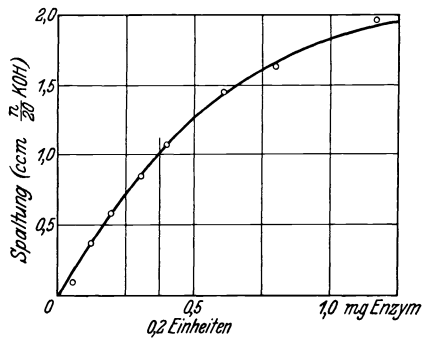


Abb. 10. Hefe-Polyptidase-Einheiten und Umsatz.

die Hälfte der vorhandenen l-Peptidmenge in Leucin und Glycyl-glycin zerlegt. In Gegenwart von großen Mengen von Diptidase ist die Bestimmungsmethode nicht streng anwendbar, da das gebildete Glycyl-glycin weiter zerlegt wird; die Werte werden in diesem Falle etwas zu hoch gefunden.

Ausführung der Bestimmung. Der Ansatz zur Enzymbestimmung besteht aus: 49 mg d,l-Leucyl-diglycin, 0,2 ccm  $\frac{1}{3}$  mol. Phosphatpuffer  $p_H = 7,0$ , 0,2 ccm 0,4 n-Ammoniumchlorid. Gesamtvolumen 2 ccm; Substrat und Enzym sind vorher mit Ammoniak auf  $p_H = 7,0$  eingestellt. Die Spaltungszeit beträgt 1 Stunde,

die Temperatur, bei der die Einwirkung stattfindet, 40°. Der Aciditätszuwachs wird in 90%iger alkoholischer Lösung gemessen mit Thymophthalein als Indicator und mit alkoholischer 0,05 n-Kallilauge.

Nachweis einer prolyptidspaltenden Peptidase: Glycerinextrakte aus Darmschleimhaut, Pankreas, Leber usw., ferner rohe Hefeautolysate greifen nach W. GRASSMANN und Mitarbeitern<sup>3</sup> Prolinpeptide wie Prolyglycin und Prolydiglycin an. Gereinigte Trockenpräparate der proteolytischen Enzyme aus Darm oder Hefe haben diese Fähigkeit verloren. Das für die Hydrolyse der Prolyptidpeptide verantwortliche Enzym ist mit keiner bisher beschriebenen Peptidase identisch, seine Isolierung aber bis jetzt nicht gelungen.

Wenn man es nicht vorzieht, zur Ersparung größerer Mengen des Peptids durch Mikrotitration nach W. GRASSMANN und W. HEYDE<sup>4</sup> die Hydrolyse des Prolinpeptids zu messen, so gestaltet sich der Nachweis des prolinpeptidspaltenden Enzyms folgendermaßen: 34 mg (= 0,1 Millimol.) Prolyglycin in wenig Wasser gelöst, werden mit verdünnter Natronlauge auf  $p_H = 7,8$  eingestellt und die Enzymlösung (etwa 0,5—1 ccm) zugegeben. Nach einer Einwirkungsdauer von etwa 1—4 Stunden wird der Aminostickstoff der Probe nach VAN SLYKE gemessen. Eine andere Probe wird sofort nach Zugabe der Enzymlösung zur Analyse gebracht. Die Differenz ergibt den Zuwachs an Aminostickstoff.

Ein genaues Maß für die Enzymwirkung ist bis jetzt nicht aufgestellt. Die Größe des Zuwachses liefert ein ungefähres Bild der vorhandenen Enzymmenge.

### $\beta$ ) Messung der tryptischen Enzyme.

Tryptische Proteinase des Pankreas (Trypsin). Man mißt dieses Enzym nach der Maximalaktivierung, die durch einen überschüssigen Zusatz

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. W. DEUTSCH: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 167, 285. — E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. SCHÄFFNER, J. J. BEK u. E. BLUM: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 17.

<sup>2</sup> W. GRASSMANN u. DYCKERHOFF: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 179, 41.

<sup>3</sup> W. GRASSMANN, H. DYCKERHOFF u. O. v. SCHÖNEBECK: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, 62, 1307.

<sup>4</sup> W. GRASSMANN u. W. HEYDE: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, 183, 32.

von Enterokinase erreicht wird, an seiner Wirkung auf Casein. Der Zuwachs an Carboxylgruppen, der dabei auftritt, wird durch Titration in alkoholischer Lösung oder auch durch Formoltritation nach SÖRENSEN gemessen. Die Aktivierung des Trypsins benötigt Zeit; man bewirkt sie während 30 Minuten bei 30°. Die optimale Wasserstoffzahl von  $p_H = 8,9$  wird durch Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer eingestellt.

Ausführung der Bestimmung<sup>1</sup>. Zur Bestimmung werden folgende Lösungen benötigt:

1. Enterokinaselösung (Darstellung S. 765). 2. 6%ige Caseinlösung. 6 g Casein nach HAMMARSTEN (KAHLBAUM) werden in einem vollkommen trockenen 100 ccm-Meßkolben mit Wasser zu einem Brei angeschüttelt, mit 6 ccm n-Natronlauge versetzt, mit Wasser aufgefüllt und bis zur Lösung geschüttelt. 3. Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, hergestellt aus n-Lösungen, im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die Enzymprobe von beispielsweise 0,1–0,2 ccm Glycerinauszug aus Pankreas (s. S. 764) oder von äquivalenten Mengen einer anderen Lösung wird mit 0,5 ccm einer Enterokinaselösung und mit Wasser in einem Fläschchen mit eingeschlifffem Stopfen auf 3,0 ccm gebracht und zur Aktivierung 30 Minuten bei 30° gehalten. Dann gibt man 5,0 ccm 6%ige Caseinlösung und 2 ccm Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer hinzu, wodurch bei der Bestimmungstemperatur von 30°  $p_H = 8,9$  entsteht. Nach der Reaktionszeit von 20 Minuten wird das Gemisch mit 5 ccm Wasser und 15 ccm absoluten Alkohol quantitativ in das Titrationsgefäß (250 ccm) übergespült und nach Zugabe von 2 ccm 0,5%iger Thymolphthaleinlösung mit 0,2 n-Kalilauge bis zur deutlichen Blaufärbung titriert; aus dieser schwach alkalischen Lösung fällt das unveränderte Casein auf weiteren Alkoholzusatz gleichmäßig und in feiner Verteilung aus. Man fügt alsdann 120 ccm siedenden absoluten Alkohol hinzu und führt die Titration bis zum Auftreten des ersten, grünlich blauen Farbtons zu Ende. Fehlergrenze etwa + 0,05 ccm.

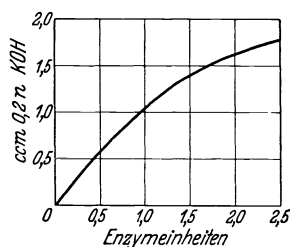


Abb. 11.  
Tryptische Proteinasemenge  
und Spaltungsgrad  
(20 Min. 30°).

Der Bestimmung liegt die empirische Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz zu Grunde, die sich aus den bei einer Reaktionsdauer von 20 Minuten ausgeführten Versuchen unter den angeführten Bedingungen ergibt und die Abb. 11 veranschaulicht. Als Maß der tryptischen Proteinase mengen dient die Proteinase-Einheit; sie ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen eine Spaltung entsprechend 1,05 ccm 0,2 n-Kalilauge bewirkt. Sie ist in etwa 0,1–0,2 ccm Glycerinauszug aus getrockneter Schweinepankreasdrüse (Darstellung S. 764) enthalten. Für die quantitative Bestimmung des Trypsins sucht man den steilen Abschnitt der Kurve auf bis zu etwa 1,4 ccm 0,2 n-Kalilauge Spaltung; denn nur bei kleinen Enzymmengen ist das Verhältnis zwischen Enzymmenge und Umsatz konstant.

Zur Bestimmung des tryptischen Enzyms siehe ferner J. H. NORTHROP<sup>2</sup> (vgl. auch S. 747). Eine nephelometrische Bestimmung des Trypsins stammt von P. RONA und H. KLEINMANN<sup>3</sup>.

Bestimmung des Aktivierungsgrades einer tryptischen Proteinaseelösung. Das Trypsin der frischen Pankreasdrüsen ist gegenüber Proteinen vollständig oder fast vollständig inaktiv; erst die Zugabe von Enterokinaselösung macht das Enzym wirksam. Beim Altern der Drüsen oder Drüsenauszüge aktiviert sich das Enzym mehr oder minder schnell von selbst<sup>4</sup>. Es ist für viele enzymatische Untersuchungen wichtig, den Aktivierungsgrad, in dem das Enzym vorliegt, zu kennen. Er kann aus zwei Analysen entnommen werden,

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, S. DUÑAITURRIA u. G. KÜNSTNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, **161**, 191.

<sup>2</sup> J. H. NORTHROP: Journ. of gen. Physiol. 1921, **4**, 227.

<sup>3</sup> P. RONA u. H. KLEINMANN: Biochem. Zeitschr. 1926, **169**, 320.

<sup>4</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. HARTENECK: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **149**, 221.

deren eine die Proteinase ohne Aktivatorzusatz, deren andere es mit einem Überschuß an Aktivator unter sonst gleichen Umständen mißt. Aus der Gegenüberstellung der erhaltenen Werte ergibt sich dann der in aktivierter Form vorliegende Anteil des Enzyms.

Eichung einer Enterokinaselösung. Für die Bestimmung der tryptischen Enzyme ist es notwendig, den Gehalt einer Enterokinaselösung an Aktivator zu kennen, um sicher zu sein, daß die Enzymbestimmung mit einem Überschuß an Aktivator ausgeführt wird. Aus einer Untersuchung von E. WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>1</sup> geht hervor, daß die tryptische Proteinase mit der Enterokinase auf stöchiometrischer Grundlage eine dissoziierende Verbindung eingeht. Diese Beziehung führt zu einer einfachen Bestimmungsmethode für den Aktivator; man vergleicht die einer bestimmten Menge inaktiven Trypsins erteilten proteolytischen Wirkungen gegenüber Casein. Als Enzymmaterial dient ein aus frischen Pankreasdrüsen bereiteter Glycerinauszug (S. 764), der möglichst inaktiv sein soll. Die Menge der zugesetzten Enterokinase wird gemessen durch die Differenz der Aciditäten zweier Proteinasebestimmungen, nämlich mit und ohne Aktivatorzusatz. Für die Eichung einer Kinaselösung ist es nötig diejenige Menge zu bestimmen, welche die der Messung zugrundegelegte Enzymmenge vollkommen aktiviert. Durch mehrere Versuche mit wechselnden Mengen Kinase ist das zu erreichen; eine Erhöhung der Kinasemenge darf dann bei vollkommener Aktivierung des Enzyms keinen größeren Aciditätszuwachs ergeben.

Ausführung. Zu je etwa 0,1 ccm inaktiven Glycerinauszuges werden wechselnde Mengen der zu prüfenden Kinaselösung gegeben, auf 3 ccm mit Wasser verdünnt und 30 Minuten bei 30° gelassen. Nach Ablauf der Aktivierungszeit werden 5 ccm 6%ige Caseinlösung und 2,00 ccm n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer (1:1) zugegeben und das Reaktionsgemisch 20 Minuten bei 30° gehalten. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt die Titration in alkoholischer Lösung, wie sie ausführlich bei der Bestimmung von tryptischer Proteinase (S. 753) beschrieben ist. Zu jeder Bestimmung ist ein Nullwert zu ermitteln, dessen Titrationswert von der Analyse abgezogen wird.

Carboxy-Polypeptidase des Verdauungstraktes<sup>2</sup>. Die Wirkung der Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas wird an einem spezifischen Substrate Chloracetyl-l-Tyrosin, und zwar nach Aufladung des Enzyms mit Enterokinase gemessen. Das Wirkungsoptimum des aktivierten Enzyms liegt für das angewandte Substrat bei  $p_H = 7,4$ . Die Hydrolyse des Substrates verfolgt man am besten durch Ermittlung des Zuwachses freier  $NH_2$ -Gruppen nach VAN SLYKE.

Ausführung der Bestimmung. 0,5150 g Chloracetyl-l-tyrosin (= 0,002 Mol.) werden in etwa 10 ccm heißem Wasser gelöst und durch Zusatz von n-Natronlauge mit Bromthymolblau als Indicator auf  $p_H = 7,4$  eingestellt; die Substratlösung wird sodann mit 20 ccm 1/15 mol. Phosphatpuffer von  $p_H = 7,4$  vermischt und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

Zu 5 ccm der so bereiteten Substratlösung (0,0002 Mol.) fügt man die zuvor während 30 Minuten und bei 30° mit Enterokinase (s. S. 765) aktivierte und auf 2,0 ccm mit Wasser verdünnte Probe der Enzymlösung hinzu und beläßt das Reaktionsgemisch sodann im Thermostaten von 30°. Nach Ablauf der Bestimmungsdauer unterbricht man die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2 ccm n-Natronlauge, durch die zugleich etwa abgeschiedenes Tyrosin gelöst wird, und mißt alsbald die Menge der reaktionsfähigen Aminogruppen nach dem Verfahren von VAN SLYKE. Zu jeder Analyse ist eine Leerbestimmung auszuführen, deren  $NH_2$ -Wert von dem der Hauptbestimmung in Abzug zu bringen ist. Die Hydrolyse des Substrates soll zwischen 20 und 80% betragen und die Dauer der Bestimmung 2 Stunden nicht überschreiten, da in längeren Zeiträumen sich Enzymzerstörung bemerkbar macht.

Die Hydrolyse des Chloracetyl-l-tyrosins verläuft gemäß einer Reaktionsgleichung erster Ordnung. Die Zeiten gleichen Umsatzes werden den angewandten Enzymmengen umgekehrt proportional, die Reaktionskonstanten des monomolekularen Zeitgesetzes den Enzymmengen proportional gefunden. Auf diese

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, 132, 181.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, 62, 2217.

Beziehungen gründet sich das Maß für die Menge des Enzyms. Die Carboxy-polypeptidase-Einheit ist das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich unter den angegebenen Bedingungen die Konstante der monomolekularen Reaktion zu 0,001 ergibt; die Reaktionskonstante ergibt also zugleich die Anzahl der Enzymeinheiten in der Bestimmungsprobe; wenn man z. B. bei der Berechnung von  $k = 1/t \cdot \log a/a - x$ ,  $a$ , die Anfangskonzentration des Substrates (0,0002 Mol) und  $x$ , die  $\text{NH}_2$ -Zunahme während der Hydrolyse, in Kubikzentimeter 0,05 n ausgedrückt, dann ist  $a = 4$ .

Als Maß für den Einheitsgrad des Enzyms gilt der Carboxy-polypeptidase-Wert, welcher die Anzahl der Carboxy-polypeptidase-Einheiten in 1 g Präparat angibt.

### γ) Messung der katheptischen Enzyme.

Carboxy-polypeptidase der Organe und Gewebe. Die Messung dieser Carboxy-polypeptidase wird nach WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern<sup>1</sup> mit Benzoyl-glycyl-glycin als Substrat durchgeführt. Das Enzym liegt in den Organen und Organauszügen in wechselndem Aktivierungsgrad vor und muß zur Bestimmung seiner Wirksamkeit maximal aktiviert werden; man erzielt die maximale Aktivierung durch einen natürlichen, in den Organen vorkommenden Aktivator, die Zookinase oder durch Schwefelwasserstoff (vgl. S. 769). Die für die Enzymwirkung gegenüber Benzoyldiglycin optimale Wasserstoffzahl ist  $p_{\text{H}} = 4,2$ . Der Reaktionsverlauf der Hydrolyse ist bei dem angewandten Substrat nahezu linear; in gleichen Zeiten werden gleiche Bruchteile des Substrates umgesetzt. Auch herrscht zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit Proportionalität. Auf dem linearen Verlauf der Hydrolyse beruht das Maß für die katheptische Carboxypolypeptidase. Als Einheit des Enzyms bezeichnet man das Hundertfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich unter bestimmten Bedingungen der Quotient aus der Menge der gebildeten  $\text{NH}_2$ -Gruppen (in Kubikzentimetern 0,2 n) und der angewandten Zeit (in Stunden) = 0,01 ergibt.

Ausführung der Bestimmung. 2,5 ccm Benzoyldiglycinlösung (100 ccm Lösung, enthaltend: 2,36 g Benzoyldiglycin, durch Zugabe von n-Natronlauge gelöst und mit Bromphenolblau als Indicator auf  $p_{\text{H}} = 4,2$  eingestellt, aufgefüllt auf 60 ccm + 40 ccm n-Acetat-Puffer  $p_{\text{H}} = 4,2$ ) entsprechend 0,00025 Mol., werden mit der durch halbstündiges Einleiten von Schwefelwasserstoff bei neutraler Reaktion aktivierten und mit Wasser auf 7,5 ccm verdünnten Probe der Enzymlösung versetzt und im Thermostaten z. B. während 12—24 Stunden bei 30° belassen. Man mißt die Enzymwirkung durch den Zuwachs reaktionsfähiger  $\text{NH}_2$ -Gruppen nach dem Verfahren von VAN SLYKE; zu jeder Analyse ist eine Leerbestimmung auszuführen. Man findet z. B. bei einer angewandten Enzymmenge von 5 ccm Glycerinauszug aus Trockenleber (Darstellung s. S. 769) nach 24 Stunden einen Zuwachs von 0,43 ccm 0,2 n, entsprechend einer Spaltung von 34%. Die Enzymeinheit berechnet sich danach aus dem Quotienten  $\frac{\text{Umsatz ccm } 0,2 \text{ n-NH}_2}{\text{Zeit (Minuten)}}$  zu 0,018.

Katheptische Proteinase (Kathepsin). Die Messung der katheptischen Proteinase wird mit Gelatine als Substrat bei einem optimalen  $p_{\text{H}} = 4,0$  ausgeführt. Das Kathepsin liegt in den Organen und Organauszügen meist in teilweise aktiver oder inaktiver Form vor. Um unabhängig von der gerade vorhandenen Menge natürlicher Aktivators, der Zookinase, die maximal mögliche Aktivität zu erreichen, vervollständigt man die Aktivierung durch Einleiten von Schwefelwasserstoff (oder durch Zugabe von Glutathion vgl. S. 758). Zur Erzielung sicherer Ausschläge bei der Hydrolyse der Gelatine durch Organauszüge ist es erforderlich, viel längere Einwirkungszeiten zu wählen, als sie für die Bestimmung der meisten anderen tierischen Proteasen angewandt werden.

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. SCHÄFFNER, J. J. BEK u. E. BLUM: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 17.

Für den Reaktionsverlauf der Proteinspaltung durch katheptische Proteinase sind bestimmte Gesetzmäßigkeiten nicht beobachtet worden. Der Bestimmungsmethode liegt die Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz in einer bestimmten Reaktionszeit, nämlich 24 Stunden, zugrunde. Die Umsätze, die sich im Anfangsbereich der Hydrolyse halten, sind unter den gewählten Bedingungen den Enzymmengen proportional. Als Kathepsin-Einheit, das Maß für die katheptische Proteinase, bezeichnet man diejenige Enzymmenge, welche unter

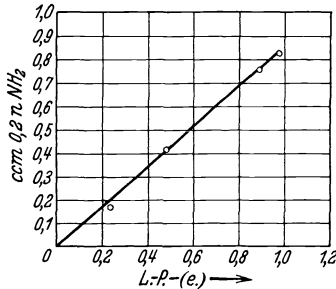


Abb. 12. Lino-Proteinase und Spaltungsgrad.

wird durch Zugabe von einigen Tropfen Octylalkohol verhindert. Hierauf fügt man 5 ccm 8%iger Gelatine und soviel n-Essigsäure (z. B. 1 ccm) hinzu, daß ein  $p_H$  von 4,0 entsteht, füllt mit Wasser bzw. mit Glycerin auf 20 ccm und zu einem Glyceringehalt von etwa 25% auf. Zur Vergleichbarkeit der Messungen ist es erforderlich, den Gehalt der Ansätze an Glycerin, welches die Enzymwirkung herabsetzt, konstant zu halten. Nun beläßt man den Ansatz 24 Stunden bei 30°. Nach Ablauf der Versuchszeit mißt man die freien Aminogruppen in 9 ccm des Ansatzes nach VAN SLYKE. Der in einer vor Beginn der Enzymwirkung auszuführenden Kontrollbestimmung ermittelte Betrag an  $NH_2$  ist von dem des Hauptversuches in Abrechnung zu bringen.

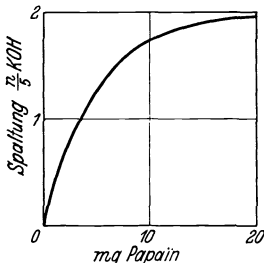


Abb. 13. Papainmenge und Umsatz bei der Hydrolyse von Gelatine (1 Stunde).

Bestimmung des Papains. Der quantitativen Bestimmung des Papains nach R. WILLSTÄTTER und Mitarbeitern<sup>1</sup> wird die Messung der Gelatinehydrolyse unter optimalen Bedingungen, d. h. bei  $p_H = 5,0$  und unter 2-stündiger Vorbehandlung mit Blausäure zugrunde gelegt. Die unter diesen Umständen und unter festgesetzten Konzentrationsverhältnissen bei einer Versuchsdauer von 1 Stunde und bei 40° beobachteten Beziehungen zwischen dem zeitlichen Ablauf der Reaktion und der Menge des Enzyms sind aus nebenstehender Kurve der Abb. 13 zu entnehmen. Die durch wechselnde Mengen eines Standardpräparates bewirkten Spaltungen innerhalb der Versuchszeit sind in der Kurve wiedergegeben. Als Einheit ist diejenige Enzymmenge festgesetzt, welche in 1 mg des Standardpräparates enthalten ist. Andere Enzympräparate sind danach auf diese Kurve zu eichen.

Ausführung der Bestimmung. Erforderliche Lösungen: 1. 1,5%ige filtrierte Auflösung von Papain (Succ. Caricae Papayae, Merck). 2. 3%ige Blausäurelösung: 10 ccm einer 6%igen Lösung von Kaliumcyanid (zur Analyse) werden mit n-Salzsäure gegen Methylrot neutralisiert, wozu etwa 8 ccm erforderlich sind. Man ergänzt das Volumen zu 20 ccm. Die Lösung ist nicht haltbar. 3.  $\frac{1}{5}$  molare Lösung von Dinatriumcitrat nach SÖRENSEN ( $p_H = 5,0$ ). 4. 6,66%ige Lösung von bester Handelsgelatine.

Zu einer Mischung von 5 ccm Dinatriumcitrat und 2 ccm Blausäurelösung, die sich in einem 25 ccm-Meßkolben befindet, fügt man eine geeignete Menge (zwischen 5 und 40 Einheiten) der zu bestimmenden unbekanntes Enzymlösung, die nötigenfalls vorher auf  $p_H = 5,0$

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. GRASSMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 184.

eingestellt worden ist, und ergänzt das Volumen zu 20 ccm. Nachdem die Mischung 2 Stunden bei 40° verblieben ist, fügt man 30 ccm der Gelatinelösung (= 2 g Gelatine) hinzu, füllt genau bis zur Marke auf, schüttelt während etwa 20 Sekunden sehr gut durch, entnimmt sofort eine Probe von 10 ccm und titriert sie in alkoholischer Lösung mit 0,2 n-Kalilauge. Der Hauptteil des Hydrolysen gemisches verbleibt im Thermostaten von 40°. Nach 1 Stunde werden erneut 10 ccm entnommen und titriert. Aus der Differenz ergibt sich die eingetretene Hydrolyse. Man entnimmt der Kurve die der gefundenen Spaltung zugehörige Anzahl von Enzymeinheiten; die Werte der Kurve beziehen sich auf die Titrationsprobe von 10 ccm.

Zur Bestimmung des Papains auf Grund der Auflösung des Fibrins nach WILLSTÄTTER und Mitarbeiter vgl. S. 748.

Proteinase der Hefe. Als Substrat zur Bestimmung der Hefeproteinase dient nach WILLSTÄTTER und GRASSMANN<sup>1</sup> Gelatine, deren Hydrolyse durch Titration in alkoholischer Lösung verfolgt wird. Das Enzym kann je nach Darstellung und Aufbewahrung in einem wechselnden Aktivierungszustand vorliegen. Zur Gewährleistung einer maximalen Aktivierung wird das Hefeenzym mit Blausäure oder Schwefelwasserstoff vorbehandelt<sup>2</sup>. Gemessen wird die Hydrolyse von 0,6 g Gelatine bei  $p_H = 5$  und in einem Volumen von 10 ccm zweckmäßig mit einer Versuchsdauer von 24 Stunden bei 40°. Die Wasserstoffionenkonzentration wird mit m/30 Dinatriumcitrat eingestellt. Bei der Ausführung der Titration selbst, die wegen der verhältnismäßig hohen Gelatinekonzentration einige Vorsicht erfordert, ist heißer Alkohol zu verwenden, der in Anteilen zugesetzt wird.

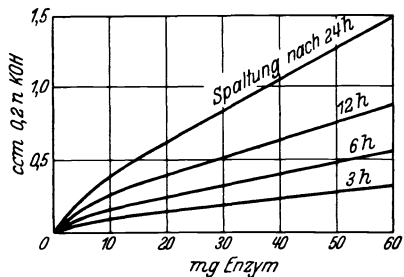


Abb. 14. Enzymmenge und Umsatz bei der Gelatinespaltung durch Hefeproteinase.

Bei frischen Autolysaten ist in der einzuhaltenden Versuchsdauer die Selbstspaltung des proteinhaltigen Enzymmaterials schon beträchtlich. Sie ist im Kontrollversuch ohne Gelatine zu ermitteln und von der gefundenen Spaltung in Abzug zu bringen. Die Störung der Bestimmung durch die ereptischen Enzyme, die ohne Zugabe von Blausäure eine beträchtliche wäre, wird durch Zugabe von Blausäure fast vollkommen aufgehoben; Blausäure ist nämlich für die ereptischen Enzyme ein starkes Gift.

Zur praktischen Bestimmung unbekannter Enzymmengen verfährt man so, daß man zu einer Lösung von 1,5 g Gelatine und 4 ccm m/5 Dinatriumcitrat (nach SÖRENSEN), die in einem 25 ccm Meßkolben auf 40° vorgewärmt sind, eine passende Menge Enzym (d. h. beispielsweise 2—5 ccm eines aus ein Teil Hefe und ein Teil Wasser gewonnenen Autolysates), die mit 5 mg HCN (Darstellung der HCN-Lösung s. bei Papain) 2 Stunden lang aktiviert wurde, zufügt, zur Marke auffüllt und nach Zugabe von zwei Tropfen Toluol und gutem Umschütteln eine Probe von 10 ccm zur Titration entnimmt. Eine weitere Probe wird aus der bei 40° gehaltenen Mischung nach 24 Stunden entnommen. Die Differenz beider Titrations zeigt die Hydrolyse an.

Die Umwertung der gefundenen Hydrolysenbeträge in Enzymeinheiten erfolgt auf Grund der in der Kurve der Abb. 14 wiedergegebenen Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz. Unter den eingehaltenen Bedingungen sind Enzymmenge und Umsatzzeit für gleiche Spaltungsbeträge innerhalb der Fehlergrenzen umgekehrt proportional. Als Hefe-Proteinase-Einheit bezeichnet man diejenige Enzymmenge, die in 100 mg des zur Standardisierung verwendeten und durch die aus der Kurve ersichtlichen Leistungen charakterisierten Präparates enthalten ist.

Bestimmung des Aktivators für katheptische Enzyme. Die Zookinase bzw. die Phytokinase kann nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. GRASSMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 153, 250.

<sup>2</sup> W. GRASSMANN u. H. DYCKERHOFF: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 179, 41.

A. PURR<sup>1</sup> in kristallisierter Form isoliert werden (Darstellung von Zookinase siehe S. 769); sie ist identisch mit dem Tripeptid Glutathion in der SH-Form. Man kann den Gehalt eines Organes bzw. eines Organauszuges an Zookinase bzw. Glutathion messen, an seiner Wirkung auf inaktive katheptische Proteinase oder auf Papain. Man mißt den Gesamtgehalt an Glutathion (S-S Form + SH-Form) nach vorgehender Reduktion mit Schwefelwasserstoff und sorgfältigem Vertreiben des Schwefelwasserstoffs im Vacuum mit Wasserstoff, den Gehalt an SH-Form ohne vorhergehende Reduktion.

Tabelle 8. Aktivatormenge und Aktivierungsleistung.

| Aktivator-<br>menge | Gemessene<br>Spaltung<br>in ccm 0,05 n-NH <sub>2</sub> | Aktivitäts-<br>steigerung |
|---------------------|--|---------------------------|
| 0                   | 0,64   | 0,48                      |
| 1                   | 1,12   | 0,96                      |
| 2                   | 1,60   | 1,36                      |
| 4                   | 2,00   | 2,00                      |
| 8                   | 2,64   | 2,04                      |
| 16                  | 2,68   | 2,04                      |

Ablauf der Aktivierungszeit wird die Aktivitätssteigerung, die das Papainpräparat durch Zugabe der Aktivatorlösung gewonnen hat, gemessen an der Wirkung auf Gelatine während 2 Stunden bei 30° und bei einem p<sub>H</sub> = 4,0. Zu den mit wechselnden Mengen von Aktivator versetzten Papainlösungen werden 2,25 ccm einer 8%igen Gelatine, sowie 2 ccm Essigsäure-Acetat-Puffer p<sub>H</sub> = 4,0 gegeben und einer zweistündigen Einwirkung bei 30° überlassen. Hierauf wird der Aminostickstoff der Probe nach VAN SLYKE gemessen. Zu jedem Versuch ist ein Kontrollversuch zu machen, dessen Aminostickstoffwert vom Hauptversuch in ergibt den Zuwachs an Aminostickstoff. Von ihm muß ferner noch die Eigenleistung des Papains, die unter den nämlichen Bedingungen nur ohne Zusatz von Aktivator gemessen wird, in Abzug gebracht werden.

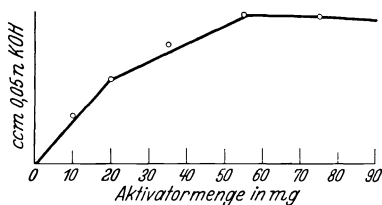


Abb. 15. Aktivierungsleistung des Glutathions auf Papain.

Zuwachs erteilt. Der Zookinasewert gibt die Anzahl Zookinaseeinheiten in 1 g Präparat an. 1 Zookinaseeinheit entspricht der Wirkung von 3,21 mg Glutathion. Tabelle 8 veranschaulicht die der Messung zugrunde gelegten Beziehungen zwischen Aktivatormenge und Papainwirkung.

In der obigen Kurve (Abb. 15) ist die Aktivitätssteigerung, die wechselnde Mengen Glutathion in der SH-Form mit 27 mg Papain bei der Einwirkung auf 0,18 g Gelatine bei 30° in 2 Stunden geben, graphisch aufgetragen. Es ist auf Grund dieser Kurve möglich, die Aktivatormenge, gemessen durch die Aktivitätssteigerung an Papain, in Milligramm Glutathion auszudrücken.

#### δ) Messung des Pepsins.

Als Substrat für die Pepsinbestimmung kommen im allgemeinen Casein oder Gelatine in Betracht. Vielfach wird zur Messung der Pepsinwirkung die Abnahme des Proteinstickstoffes herangezogen, wie z. B. in der FULD-EGESCHEN

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 198, 260.

Wirksamkeitsprüfung für Pepsin, deren Prinzip früher (vgl. S. 748) beschrieben ist. Auch die Veränderung der Viscosität ermöglicht eine Verfolgung der peptischen Wirkung. Gerade die Veränderungen der physikalischen Eigenschaften des Substrates sind beim Pepsin sehr groß; man kann also mit Hilfe der Viscositätsmessung schon geringe Mengen des Enzyms sehr exakt feststellen. Ein genaues Enzymmaß ist indes auf diese Methode nicht gegründet (vgl. dazu E. WALDSCHMIDT-LEITZ und E. SIMONS<sup>1</sup> ferner H. HOLTER<sup>2</sup>). Am besten erfolgt die Messung der Pepsinwirkung nach einer Methode, durch welche der Zuwachs an freiem Aminostickstoff oder an Carboxylgruppen bestimmt wird.

In neuester Zeit ist die Einheitlichkeit des Pepsins in Zweifel gezogen worden. H. HOLTER<sup>2</sup> fand, daß der Viscositätsänderung nicht in jedem Präparat ein gleicher Spaltungsgrad, gemessen durch Titration mit 0,1 n-Salzsäure in acetonhaltigen Lösung, entspricht. Durch Adsorptionsmittel gelang ihm auch eine teilweise Trennung beider Wirkungen.

Die Pepsinwirkung folgt keinem einfachen Reaktionsgesetz. J. N. NORTHRUP<sup>3</sup> gibt eine vorläufige Definition der Aktivität eines Pepsinpräparates. Eine Enzymeinheit ist darnach diejenige Enzymmenge, die ein Milliäquivalent an Carboxylgruppen in 1 Minute in Freiheit setzt, bei einer Temperatur von 35,5°, optimalem  $p_H = 2,0-2,5$  und einer Substratkonzentration von 5%. Als Maß für die Enzymkonzentration gilt der Enzymwert, der die Enzymeinheiten je Gramm Präparat angibt. Die Enzymkonzentration muß so gewählt werden, daß zwischen Enzymmenge und Umsatz Proportionalität herrscht, was in gewissen Grenzen der Fall ist. Die Bestimmung ist außerdem im Anfangsbereich der Spaltung vorzunehmen, um die etwa hemmende Wirkung der Spaltprodukte auszuschalten. Der Zuwachs an Carboxylgruppen kann durch Formoltitration nach SÖRENSEN oder durch Titration in alkoholischer Lösung bestimmt werden, wobei durch Vortitration in wäßriger oder in verdünnt alkoholischer Lösung ein klumpiges Ausfallen des Substrates vermieden werden kann. Ebenso gut kann man zur Pepsinmessung den Zuwachs an Aminostickstoff benutzen, den man mit der Methode nach VAN SLYKE bestimmt. H. HOLTER empfiehlt die Pepsinwirkung durch Titration in acetonhaltiger Lösung nach K. LINDERSTRÖM-LANG (vgl. S. 747) mit 0,1 n-Salzsäure zu verfolgen.

Man führt die Proteinhydrolyse durch Pepsin nach WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>1</sup> folgendermaßen aus: 5 ccm 6%ige Caseinlösung (HAMMARSTEN) werden mit 5 ccm 1/3 Mol. Citratpuffer von  $p_H = 1,2$  versetzt, wodurch ein  $p_H = 2,8$  entsteht und dazu die zu prüfende Pepsinmenge in gelöster Form gegeben. Eine Probe wird sofort, eine andere nach Ablauf einer passenden Zeit (1—2 Stunden z. B.) der alkoholischen Titration oder der Aminostickstoffbestimmung unterworfen.

Messung der Labwirkung. Nach MICHAELIS und ROTHSTEIN<sup>4</sup> wird durch Reihenversuche diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Lablösung festgestellt, die in gleicher Zeit die gleiche Wirkung zeigt, wie eine bestimmte, stets reproduzierbare Einheitsfermentlösung.

Nach MICHAELIS ist eine Pufferung der Milch nicht nur unnötig, sondern sogar schädlich, da die Milch vermöge ihres Gehaltes an Phosphaten und Casein ein so guter Puffer ist, daß ihr  $p_H$  durch alle praktisch vorkommenden Fermentverdünnungen nicht verändert wird, daß aber ein Teil des Labs bei der Neutralisierung durch die geringfügigste alkalische Reaktion (beim Eintropfen) mit großer Geschwindigkeit irreversibel zerstört wird. Das  $p_H$  der Milch entspricht gewöhnlich dem Optimum der Labwirkung.

Erforderliche Lösungen. 1. Milch wird frisch abgekocht, abgekühlt und mit  $\frac{1}{10}$  ihres Volumen Calciumchloridlösung (10 g möglichst trockener Krystalle von wasserhaltigem Calciumchlorid auf 100 ccm Wasser) versetzt.

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. E. SIMONS: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 156, 114.

<sup>2</sup> H. HOLTER: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 196, 1.

<sup>3</sup> J. H. NORTHRUP: Journ. of gen. Physiol. 1930, 13, 739, 767.

<sup>4</sup> L. MICHAELIS u. ROTHSTEIN: Biochem. Zeitschr. 1920, 105, 60.



2. Herstellung der Fermentkontrolllösung: Ein gutes, festes Pepsinpräparat wird mit der 10fachen Menge 10%iger Natriumchloridlösung versetzt, etwa eine Woche bei Zimmertemperatur aufbewahrt, filtriert mit der gleichen Menge Glycerin versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Eine solche Lösung ist unbegrenzt haltbar. Von dieser Standardfermentlösung wird eine Verdünnung 1:10 000 zum Versuch hergestellt.

Ausführung. In einer Reihe von 5 Reagenzgläsern werden je 2 ccm Wasser gebracht; in das erste Röhrchen kommen 2 ccm der zu untersuchenden Fermentlösung; nach Vermischen werden diesem 2 ccm entnommen und in das zweite Röhrchen gebracht usw. Jedes folgende Röhrchen enthält also die halbe Fermentmenge des vorangehenden. Nunmehr werden in ein weiteres Röhrchen 2 ccm der Kontrolllösung und dann schnell hintereinander in jedes Röhrchen 2 ccm Milch gebracht. Die Mischung wird sofort umgeschüttelt und die Gerinnung bei Zimmertemperatur beobachtet. Die Gerinnung der Kontrolle wird in der Regel zwischen die zweier benachbarter Röhrchen fallen. Je nach dem Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung wird man die zweite Versuchsreihe mit der unverdünnten 10fach, 100fach oder dgl. verdünnten Lösung anfangen.

Der Hauptversuch besteht in einer genauen Austitrierung. Angenommen z. B. die Gerinnung der Kontrolle sei zwischen der 100fachen und 200fachen Verdünnung aber viel näher an der 100fachen erfolgt, so würde man nun etwa eine 80fache Verdünnung der zu untersuchenden Lösung herstellen. Von dieser füllt man in eine Reihe von 4 Reagenzgläsern 2,0, 1,6, 1,3, 1,0 ccm und füllt die Röhrchen mit Wasser alle auf 2 ccm auf. Ein 5. Röhrchen wird mit 2 ccm der Kontrollfermentlösung gefüllt. Nunmehr werden in jedes Röhrchen 2 ccm Milch rasch einpipettiert, und zwar in der Reihenfolge Röhrchen I, II. Kontrolle III, IV. Da die Kontrolle als mittelstes Röhrchen eingefüllt wird, ist der zeitliche Unterschied jedes Röhrchens gegen die Kontrolle nicht über 12 Sekunden, was in Anbetracht der gesamten Gerinnungszeit (8—10 Minuten) zu vernachlässigen ist. Fällt die Gerinnungszeit der Kontrolle mit der eines Röhrchens der Reihe zusammen, so ist der Fermentgehalt der zu untersuchenden Lösung gleich den Verdünnungsgrad dieses Röhrchens; fällt sie hingegen nicht zusammen, so wird die der Kontrolle gleichwertige Verdünnung durch Interpolation oder durch eine weitere, noch feiner abgestufte Verdünnungsreihe ermittelt. Die Interpolation geschieht durch Anwendung des FULDSchen Labzeitgesetzes<sup>1</sup>, nach dem das Produkt aus Fermentkonzentration und Zeit konstant ist.

Da frische Milch oft wechselnde Gerinnungszeiten gibt, wird vielfach zum Studium der Labwirkung Trockenmilch verwendet um eine konstante Zusammensetzung zu gewährleisten. Vgl. P. RONA und GABBE<sup>2</sup>.

## 2. Gewinnung und Isolierung der Proteasen des tierischen Verdauungstraktes.

Die ereptischen Enzyme des Verdauungstraktes finden sich vornehmlich in der Schleimhaut des Dünndarms. Die ereptischen Enzyme in der Pankreasdrüse und ihren Extrakten dürfen dagegen streng genommen nicht zu den Verdauungsenzymen gerechnet werden; aus Untersuchungen von E. LEBRETON und F. MOCORA<sup>3</sup> geht nämlich hervor, daß sie im sezernierten Pankreassaft fehlen, also endocellulär sind. Da sie indes in den Extrakten der Pankreasdrüse immer zu finden sind, so ist die Beschreibung gemeinsam mit den sezernierten Enzymen der Drüse gerechtfertigt. Untergeordnete Bedeutung hat ferner noch das Vorkommen ereptischer Enzyme im Speichel.

Der ereptische Enzymkomplex kann in zwei Komponenten aufgeteilt werden, in eine Dipeptidase, deren spezifischer Wirkungsbereich auf den Abbau der letzten Stufe der Eiweißhydrolyse, der Dipeptide, beschränkt ist, und in eine Aminopolypeptidase, deren Aufgabe es ist, Polypeptide zu hydrolisieren. In den ungereinigten Enzympräparaten findet sich außerdem fast immer eine Prolylpeptidase, welche spezifisch eingestellt ist auf die Spaltung von Prolinpeptiden.

Die tryptischen Enzyme des Verdauungstraktes kommen in der Pankreasdrüse vor und werden daraus in den Darm sezerniert, so daß auch in der Darmschleimhaut immer geringe Mengen dieser Enzyme aufgefunden werden.

<sup>1</sup> E. FULD: Biochem. Zeitschr. 1907, 4, 54.

<sup>2</sup> P. RONA u. GABBE: Biochem. Zeitschr. 1922, 134, 39.

<sup>3</sup> E. LEBRETON u. F. MOCORA: Compt. rend. Paris 1931, 192, 1492.

Sie lassen sich in eine Peptidase, die Carboxy-polypeptidase und eine Proteinase aufteilen. Beide Enzyme werden durch einen Zusatzstoff, die Enterokinase, die im Darm vorkommt, erst in die wirksame Form übergeführt. Die Proteinase baut Eiweißkörper und hochmolekulare Abbauprodukte derselben zu niederen Stufen ab, während die Carboxypolypeptidase Peptide mit besonderen Bausteinen (s. Bd. 1, S. 722) zu hydrolisieren vermag.

### Proteolytische Enzyme der Darmschleimhaut.

Für die Darstellung stark wirksamer sowie einheitlicher ereptischer Enzympräparate eignet sich vor allem die Schleimhaut des oberen Teiles des Dünndarms der meisten Tierarten, vorzugsweise des Schweines. In der Darmschleimhaut ist der ereptische Enzymkomplex begleitet von einer relativ geringen Menge des tryptischen Enzyms, deren Abtrennung durch Tonerdeadsorption gelingt. Die Gewinnung von reinem Darmsekret, in dem sich die ereptischen Enzyme finden, ist durch Anlegung einer THIRY-VELLASchen Darmfistel an einem Hunde möglich; die Operation ist jedoch sehr schwierig (vgl. A. BICKEL „Operative Gewinnung von Sekreten“<sup>1</sup>).

#### a) Darstellung des Ausgangsmaterials<sup>2</sup>.

Als Ausgangsmaterial dient eine Suspension der rohen, zerkleinerten Darmschleimhaut in 87%igen Glycerin. In dieser glycerinhaltigen Aufschlammung, die als Sammelpräparat dient, sind die proteolytischen Enzyme fast unbegrenzt haltbar. Zur Gewinnung der Schleimhaut wird nur der oberste Meter des Dünndarms, der am enzymreichsten ist, verwendet.

Der gründlich durchgespülte Dünndarm wird vom anhängenden Fett befreit und in Stücke geschnitten; die einzelnen Stücke werden mit dem Messerrücken sorgfältig ausgestreift, wobei die Schleimhaut aus dem Darmabschnitt austritt. Die frische Schleimhaut wird in der Reibschale mit dem fünffachen Volumen 87%igen Glycerins gut verrührt. Man läßt die Suspension vor Benutzung zweckmäßig einige Tage stehen. Zur Anwendung verdünnt man die Glycerinsuspension mit dem gleichen Volumen Wasser und schleudert auf der Zentrifuge von den gröberen Bestandteilen ab.

Essigsäurefällung. Eine erste Reinigung wird durch Fällung mit Essigsäure erreicht. 100 ccm mit Wasser geklärten Glycerinauszugs aus Schleimhaut werden mit 1,5 ccm 1 n-Essigsäure versetzt und zentrifugiert. Der Niederschlag muß sich gut absetzen und die überstehende Flüssigkeit klar sein. Ist das nicht der Fall, so werden noch einige Tropfen Essigsäure nachgegeben; die nötige Essigsäure schwankt etwas je nach Beschaffenheit der Schleimhaut. Für die Enzymausbeute ist es günstig, diese und die folgenden Reinigungsvornahmen unter Eiskühlung auszuführen. Die Enzymausbeuten betragen in der Mutterlauge der Essigsäurefällung zwischen 60 und 80%, und zwar sind die Verluste an Dipeptidase größer, als die an Polypeptidase: die Dipeptidase wird leichter durch die saure Reaktion des Milieus geschädigt. Man wird also vermeiden, die Enzymlösungen länger als unbedingt nötig ist, bei saurer Reaktion stehen zu lassen.

#### β) Abtrennung der tryptischen Enzyme durch Tonerdeadsorption.

Durch Anwendung der Tonerdeadsorption gelingt es, die tryptischen Beimengungen vollständig abzutrennen. Bei saurer Reaktion ( $p_H = 4-4,5$ ) werden die ereptischen Enzyme von Tonerde der Sorte C $\gamma$  (s. S. 712) leicht aufgenommen, während die tryptischen Enzyme, in einer geringen Konzentration vorliegend, so gut wie nicht adsorbiert werden und in der Mutterlauge der Tonerdeadsorption verbleiben. Die Elution der ereptischen Enzyme aus dem Tonerdeadsorbat gelingt in guter Ausbeute durch Einwirkung von 0,04 n-Ammoniak oder besser noch von 1/15 mol sec. Phosphatlösung, wobei man zur Stabilisierung des Enzyms Glycerin zusetzt.

<sup>1</sup> Vgl. E. BICKEL in „Methodik der Fermente“, herausgegeben von C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN, 1929. S. 596.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. SCHÄFFNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 151, 31.

Ausführung. 100 ccm Mutterlauge der Essigsäurefällung werden mit 1,5 ccm n-Natriumacetatlösung und 3 ccm n-Essigsäure-Acetat-Puffer  $p_H = 4,0$  auf ein  $p_H = 4,0$  gebracht und mit 15 ccm Tonerdesuspension (enthaltend 150 mg  $Al_2O_3$ ) versetzt. Die Mischung wird mehreremals durchgeschüttelt und dann das Adsorbat auf der Zentrifuge abgeschleudert. Das Adsorbat wird zweimal mit je etwa 25 ccm 25%igem Glycerinwasser, das durch einige Tropfen Essigsäure-Acetat-Puffer auf  $p_H = 4,5$  gebracht ist, gut verrührt und zentrifugiert; hierauf eluiert man mit 50 ccm 0,2 n-Phosphat-Puffer von  $p_H = 8,2$  (20% Glycerin enthaltend). An Stelle des Phosphats kann mit weniger guten Ausbeuten 0,05 n-Ammoniak verwendet werden. Die Elution schleudert man wieder vom Tonerdegel ab und neutralisiert sie vorsichtig mit verdünnter Essigsäure; sie soll die Hauptmenge der ereptischen Enzyme (80%), aber gar keine tryptische Proteinase enthalten. Diese ist in der Adsorptionsrestlösung angereichert.

Folgende Enzymbestimmungen sind auszuführen: 1. Prüfung auf Dipeptidase mit 2 ccm Enzymlösung: Ausführung siehe S. 749. Der Aciditätszuwachs soll in 1 Stunde 0,8—1,2 ccm 0,2 n-Kalilauge betragen.

2. Prüfung auf Aminopolypeptidase mit 2 ccm Enzymlösung: Ausführung siehe S. 751. Der Aciditätszuwachs soll in 1 Stunde 1,0—1,5 ccm 0,2 n-Lauge betragen.

3. Prüfung auf Freiheit von tryptischer Proteinase: Auf ein Gemisch von 5 ccm 6%iger Caseinlösung und 2 ccm Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer 1:1 läßt man 2 ccm Enzymlösung einwirken. Aktivierung mit Enterokinase ist hierbei unnötig, da Kinase in Darmauszügen im Überschuß vorhanden ist. Ausführung der Bestimmung siehe S. 753. Es darf in 20 Stunden kein nennenswerter Aciditätsunterschied (nicht größer als 0,1 ccm 0,2 n-Kalilauge) auftreten.

#### γ) Abtrennung der Dipeptidase von der Aminopolypeptidase durch Adsorption an Eisenhydroxyd.

Für die Abscheidung der Dipeptidase und die Gewinnung einheitlicher Polypeptidase eignet sich nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. K. BALLS<sup>1</sup> die Adsorption an gealtertes rotes Eisenhydroxyd (Darstellung s. S. 714) bei einem  $p_H = 4,0$ . Zur Eisenhydroxydadsorption verwendet man entweder die durch Essigsäurefällung vorgereinigten Auszüge aus Darmschleimhaut oder auch die Elutionen der Tonerde-Adsorption, die dann aber nicht mit Phosphat sondern mit Ammoniak ausgeführt werden soll, da nämlich sonst das Phosphat mit dem Metallhydroxyd Verbindungen eingehen würde, die die Adsorption stören. Durch wiederholte Adsorption an Eisenhydroxyd gelingt es, die Dipeptidase vollkommen von der in der Restlösung zurückbleibenden Polypeptidase abzutrennen. Das Eisenhydroxyd soll mehrere Monate gealtert sein. Die zur vollständigen Adsorption notwendige Adsorbensmenge ist in einem Vorversuch auszuprobieren; denn jedes neu dargestellte Eisenhydroxyd zeigt ein in quantitativer Hinsicht geändertes Verhalten, auch die Alterungszeit spielt für die Adsorptionseigenschaften eine Rolle. So kann im folgenden keine auf alle Fälle passende Vorschrift, sondern nur ein Beispiel einer Trennung gegeben werden. Besonders sind zu große Mengen an Adsorbens zu vermeiden; sie wirken zu unspezifisch. Außerdem ist darauf zu achten, daß in hochgereinigten Lösungen die Polypeptidase leichter der Adsorption unterliegt, als in Lösungen, die mit viel Begleitstoffen verunreinigt sind. Es kann in manchen Fällen zweckmäßig sein, die Adsorption mit gefällttem und gealtertem Eisenhydroxyd zu beginnen und sie dann durch Anwendung von Hämatit zu vervollständigen. Hämatit adsorbiert nämlich Dipeptidase äußerst spezifisch, wenngleich sein Adsorptionsvermögen infolge der geringen Oberfläche ein kleines ist.

Beispiel einer Abtrennung. 150 ccm Glycerinsuspension aus Darmschleimhaut werden mit 150 ccm Wasser und mit 4 ccm n-Essigsäure versetzt. Nach Abtrennung des dabei entstehenden Niederschlags auf der Zentrifuge werden in der Restlösung 10 ccm Eisenhydroxydaufschlammung (300 mg  $Fe_2O_3$ ) suspendiert und nach einigem Schütteln davon abzentrifugiert. Die resultierende Restlösung wird hierauf noch fünfmal mit je 2 ccm Eisenhydroxyd auf die nämliche Weise behandelt. Dabei geht etwas Eisenhydroxyd

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. K. BALLS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, **63**, 1203.

kolloid in Lösung; man entfernt es durch Filtration über Kieselgur. Die Enzymlösung wird sodann neutralisiert.

Zur Prüfung auf Freiheit von Dipeptidase wird 1 ccm Enzymlösung angewendet. Ausführung der Bestimmung siehe S. 749. In beispielsweise 14 Stunden soll kein größerer Aciditätszuwachs eintreten, als 0,10 ccm 0,2 n-Lauge entspricht, widrigenfalls neuerdings mit Eisenhydroxyd zu adsorbieren ist. Die Prüfung auf Polypeptidase soll mit 1 ccm Enzymlösung in 1 Stunde einen Aciditätszuwachs entsprechend etwa 1,0 ccm 0,2 n-Kalilauge ergeben. Die Enzymausbeute beträgt bei dieser Operation zwischen 50—60% der Ausgangslösung. Ausführung der Bestimmung siehe S. 751.

#### δ) Steigerung des Reinheitsgrades der Aminopolypeptidase.

Durch Ausfällen in 45%igen Aceton gelingt es nach A. K. BALLS und F. KÖHLER<sup>1</sup> die Aminopolypeptidase aus den mit Eisenhydroxyd vorgereinigten Lösungen in etwa 10mal größerer Reinheit, bezogen auf die Eisenhydroxydrestlösung, und in etwa 145mal größeren Reinheit, bezogen auf das Ausgangsmaterial (Darmschleimhaut des Schweines) abzuschneiden.

Ausführung. 100 ccm der mit Eisenhydroxyd vorgereinigten dipeptidasefreien Lösung werden auf  $-5^{\circ}$  bis  $-10^{\circ}$  abgekühlt und mit 80 ccm ebenso stark gekühltem, absolutem Aceton gefällt. Dabei tritt ein geringer Niederschlag auf. In die Lösung gibt man 0,7 g Kieselgur und saugt damit möglichst schnell den Niederschlag ab, verrührt die Kieselgur 5 Minuten lang intensiv mit 20 ccm 20%igem Glycerinwasser und filtriert ab. Von 1 ccm wird die Enzymbestimmung ausgeführt.

Beispiel einer Reinheitssteigerung. In 1 ccm der Eisenhydroxydlösung sind 0,00827 Polypeptidase-Einheiten enthalten; Trockengewicht dieser Lösung 0,40 mg. Polypeptidasewert = 0,0207. In 1 ccm der durch Acetonfällung gereinigten Enzymlösung sind 0,01522 Polypeptidase-Einheiten mit einem Trockengewicht von 0,07 mg enthalten. Polypeptidasewert = 0,2174.

#### ε) Isolierung der Dipeptidase aus den Eisenadsorbaten

führt bis jetzt zu keinen vollkommen polypeptidasefreien Lösungen, sondern nur zu einer weitgehenden Anreicherung des Enzyms gegenüber der Polypeptidase. Solche Dipeptidaselösungen werden nach BALLS und KÖHLER<sup>2</sup> auf folgende Weise hergestellt:

20 ccm einer Lösung, die aus Darmschleimhaut hergestellt ist und durch Fällung mit Essigsäure vorgereinigt ist, werden auf ein  $p_H = 5,0$  gebracht und einmal mit 5 ccm einer wäßrigen Suspension von 200 mg feingepulvertem Hämatit adsorbiert. Das Adsorbat wird zweimal mit 20%igem Glycerinwasser, das Acetatpuffer von  $p_H = 4,7$  enthält, gewaschen; dann wird mit 10 ccm einer 20% Glycerin enthaltenden 0,1 n sekundären Phosphatlösung eluiert, nach 30 Minuten durch eine dünne Kieselgurschicht abfiltriert und neutralisiert. Alle Operationen werden bei einer Temperatur von  $0^{\circ}$  bis  $5^{\circ}$  ausgeführt. Zur Enzymprüfung wählt man zweckmäßig lange Zeiten (z. B. 24 Stunden). Die Elution enthält 0,00010 Dipeptidase-Einheiten und 0,00003 Polypeptidase-Einheiten.

#### ζ) Abtrennung des Prolin-peptidspaltenden Enzyms von den ereptischen Enzymen<sup>3</sup>.

Die prolin-peptidspaltende Komponente, die in den rohen Auszügen aus Darmschleimhaut und Pankreas, sowie in Hefeautolysaten vorhanden ist, findet sich in den gereinigten, besonders durch Acetonfällung hergestellten Trockenpräparaten nicht mehr. Eine Abtrennung dieses Enzyms von den anderen proteolytischen Enzymen ist daher leicht durchzuführen. Dagegen ist eine Isolierung der prolin-peptidspaltenden Komponente selbst noch nicht gelungen; die geringe Konzentration, in der das Enzym vorliegt, ist dem im Wege.

<sup>1</sup> A. K. BALLS u. F. KÖHLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1931, **64**, 294.

<sup>2</sup> A. K. BALLS u. F. KÖHLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1931, **64**, 34.

<sup>3</sup> W. GRASSMANN, H. DYCKERHOFF u. O. v. SCHÖNEBECK: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, **62**, 1307.

### b) Proteolytische Enzyme des Pankreas.

Man gewinnt die proteolytischen Enzyme des Pankreas am besten durch Extraktion der mit Aceton und Äther getrockneten Drüse mit Glycerin. Die dabei erhaltene Glycerinlösung ist fast unbeschränkt haltbar. Man kann so auch wäßrige Extrakte aus frischen Drüsen darstellen, die sehr wirksam, aber nicht haltbar sind; eine vorsichtige Trocknung wäßriger Extrakte zu einem haltbaren Trockenpräparat ist möglich. Zur Gewinnung des Pankreassaftes ist die Anlegung einer permanenten Fistel des Pankreasausführungsganges nach dem PAWLOWSCHEN Prinzip nötig (vgl. dazu A. BICKEL<sup>1</sup>).

#### a) Gewinnung des Ausgangsmaterials.

Die Trocknung der Pankreasdrüsen wird mit Aceton und Äther durchgeführt, wie sie S. 720 beschrieben ist. Zur Darstellung inaktiven Enzymmaterials ist es unbedingt notwendig, ganz frische, möglichst noch körperwarme Drüsen zu verwenden; auch eignen sich Rinderdrüsen zu diesem Zwecke mehr als Schweinedrüsen, weil sie sich nicht so leicht selbst aktivieren. Aktives Enzymmaterial erhält man ohne weiteres, wenn man den Brei von Schweinepankreas vor der Entwässerung mit Aceton mehrere Stunden stehen läßt. Die getrocknete Drüse wird gepulvert, gesiebt und hierauf mit 87%igem Glycerin im Verhältnis 1:10 gut verrührt. Nach 24stündigem Stehen wird durch Faltenfilter (zweckmäßig Schleicher & Schüll 1117 1/2) filtriert. Der Glycerinextrakt aus Pankreas enthält die ereptischen Enzyme Dipeptidase und Aminopolypeptidase, und die tryptischen Enzyme Proteinase und Carboxypolypeptidase.

#### β) Abtrennung der ereptischen von den tryptischen Enzymen<sup>2</sup>.

Die Trennung der beiden Enzymkomplexe wird wie bei den Auszügen aus Darm durch Tonerdeadsorption erreicht; es ist eine mehrmalige Wiederholung der Adsorption erforderlich, um ihre Trennung zu vervollständigen. Erepsin-freie Lösungen tryptischer Enzyme werden somit erhalten, wenn man Glycerin-extrakte aus Pankreas mehrmals hintereinander mit Tonerde C  $\gamma$  bei  $p_H = 4,0$  behandelt; die Restlösung dieser Adsorptionen enthält die tryptischen Enzyme-Proteinase und Carboxypolypeptidase — frei von den ereptischen Enzymen.

Ausführung. 100 ccm Glycerinextrakt aus getrockneter Pankreasdrüse werden mit dem gleichen Volumen Wasser und mit 5 ccm n-Essigsäure-Acetat-Puffer von  $p_H = 4,0$  verdünnt und mit 12 ccm Tonerde C  $\gamma$  (240 mg  $Al_2O_3$ ) adsorbiert. Das Adsorbat wird in der Zentrifuge abgeschleudert. Die Mutterlauge dieser Adsorption wird noch 3—4mal in gleicher Weise mit je 12 ccm Tonerde C  $\gamma$  adsorbiert. Hierauf wird die Restlösung mit verdünnter Lauge neutralisiert und ihr Enzymgehalt bestimmt.

Die Enzymbestimmungen werden folgendermaßen ausgeführt: 1. Prüfung auf Freiheit von ereptischen Enzymen: 2 ccm der Enzymlösung dürfen bei Einwirkung auf Leucylglycin bzw. Leucyldiglycin unter den Bedingungen der Bestimmung für die ereptischen Enzyme (s. S. 749—751) in 6—8 Stunden keinen nennenswerten Aciditätszuwachs hervorrufen, widrigenfalls die Adsorption mit Tonerde weiter fortgesetzt werden muß. 2. Prüfung auf tryptische Proteinase: 1—2 ccm Enzymlösung sollen nach Aktivierung mit Enterokinase unter den Bedingungen der Bestimmung (s. S. 753) in 20 Minuten eine Spaltung von Casein entsprechend 1,0 ccm 0,2 n-Kalilauge hervorrufen. 3. Prüfung auf Carboxypolypeptidase: 2 ccm Enzymlösung sollen nach Aktivierung mit Enterokinase in 1 Stunde unter den Bedingungen der Bestimmung eine Spaltung von Chloracetyl-1-tyrosin entsprechend 0,25 bis 0,50  $\frac{1}{5}$  n-NH<sub>3</sub> hervorrufen.

Schwieriger als die Darstellung erepsinfreier tryptischer Enzyme ist die Reindarstellung der ereptischen Enzyme des Pankreas, da diese Enzyme in einem benachteiligten Konzentrationsverhältnis gegenüber dem Trypsin stehen.

<sup>1</sup> E. BICKEL in „Methodik der Fermente“, herausgegeben von C. OPPENHEIMER und L. PINKUSSEN, 1929. S. 569.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. HARTENECK: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 147, 286.

Man erreicht sie nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. HARTENECK<sup>1</sup> durch Elution der bei der Darstellung von tryptischen Enzymen gewonnenen Adsorbate mittels 0,05 n-Ammoniak und öfterer Wiederholung der Adsorption und Elution.

### γ) Abtrennung der Carboxypolypeptidase von den tryptischen Proteinase.

Die Abtrennung der Carboxypolypeptidase von der tryptischen Proteinase gelingt nach WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR<sup>2</sup> durch Adsorption an Tonerde C γ bei neutraler Reaktion. Nach öfter wiederholter Adsorptionsvornahme findet sich die Proteinase in der Adsorptionsmutterlauge in guter Ausbeute frei von dem polypeptidsplattendem Enzym. In der Elution der Tonerdeadsorbate findet sich dagegen die Carboxypolypeptidase neben nur geringen Anteilen an Proteinase, deren vollständige Abtrennung, wenn auch mit bedeutenden Verlusten durch eine oder mehrere Wiederholungen der Tonerdeadsorption gelingt. Auch hier wechselt, wie bei der Darstellung der Aminopolypeptidase, die zur Abtrennung notwendige Menge des Adsorbens je nach seinen Adsorptionseigenschaften und je nach den Eigenschaften des Glycerinextraktes.

Beispiel einer Darstellung von carboxy-polypeptidasefreier tryptischer Proteinase. 100 ccm Enzymlösung, aus 50 ccm Glycerinauszug von Trockenpankreas durch Verdünnen mit 50 ccm Wasser und 4maliger Behandlung mit je 5,0 ccm Tonerde C γ (= je 125 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) bei p<sub>H</sub> = 3,8 bereitet, von ereptischen Enzymen frei, wird durch 6- bis 12malige Adsorption bei p<sub>H</sub> = 7,0 mit je 6,0 ccm Tonerde C γ (= je 150 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) von der Carboxypolypeptidase befreit. Die Adsorptionsrestlösung enthält die Proteinase in guter Ausbeute (30—40%). Ein zu häufiges Adsorbieren ist wegen der dann eintretenden Proteinaseverluste zu vermeiden. Man prüfe auf Vollständigkeit der Abtrennung der Carboxypolypeptidase: 2 ccm Enzym dürfen bei längerer Einwirkung auf Chloracetyl-1-tyrosin (z. B. in 2—4 Stunden) unter den Bedingungen der Bestimmung (s. S. 754) keinen Aminostickstoffzuwachs im VAN SLYKE-Apparat geben. Den Gehalt an Proteinase bestimmt man wie üblich nach Maximalaktivierung mit Enterokinase (s. S. 753).

Beispiel einer Darstellung von proteinasefreier Carboxy-polypeptidase. Die bei der Darstellung der Proteinase bei neutraler Reaktion gewonnenen Tonerdeadsorbate der 1., 2., 3. Adsorption werden vereinigt und nach Waschen mit 40 ccm 20%igem Glycerin mit 50 ccm 0,04 n-Ammoniak (20% Glycerin enthaltend) eluiert. In der Elution wird durch 3malige Behandlung mit je 4,0 ccm Tonerde (je 100 mg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) bei p<sub>H</sub> = 7,0 neuerdings adsorbiert und wie oben aus dem Adsorbat eluiert. Adsorption und Elution ist bei nicht vollständiger Abtrennung zu wiederholen.

Nur kurz kann darauf hingewiesen werden, daß die gereinigte tryptische Proteinase nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeiter<sup>3</sup> in den meisten Fällen noch eine spezifisch auf Spaltung basischer Eiweißkörper (Protamine) und basischer Peptone eingestellte Protease, die Protaminase enthält. Sie hydrolysiert Protamine rasch bis zu einer gewissen Abbaustufe. Eine Abtrennung der Protaminase von der Proteinase ist bis jetzt nicht durchgeführt. Ein Nachweis neben Proteinase gelingt nur in vollkommen inaktiven Lösungen der Proteinase, da sich sonst beide Enzymwirkungen überdecken.

### Darstellung von Enterokinase<sup>4</sup>.

Die Enterokinase wird aus der Schleimhaut von Schweinedünndarmen gewonnen. Die Schleimhaut je des obersten Meters der Därme wird ausgeschabt und mit Aceton und Äther in der bei der Trocknung der Pankreasdrüse beschriebenen Weise und in den gleichen Mengenverhältnissen von Organmaterial und

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. HARTENECK: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **147**, 286.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, **62**, 2217.

<sup>3</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, F. ZIEGLER, A. SCHÄFFNER u. L. WELL: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **197**, 219.

<sup>4</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **142**, 217. — E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. G. KÜNSTNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, **171**, 290 und zwar S. 299.

Lösungsmittel getrocknet und so als hellgelbes Pulver erhalten. Aus dem Trockenpräparat wird die Enterokinase mittels verdünnten Ammoniaks bei konstanter Temperatur während mehrerer Stunden extrahiert.

Ausführung. 10 g feingepulvertes und gesiebtes Darpulver werden mit 500 ccm 0,04 n-Ammoniak angeschüttelt und 3 Stunden bei 37° gehalten, sodann wird vom ungelösten abzentrifugiert. Die Lösung wird (zweckmäßig in einem FAUST-HEIMschen Abdampfapparat, bei einer Temperatur zwischen 25 und 30° auf die Hälfte ihres Volumens eingengt, wobei die Hauptmenge des Ammoniaks ausgetrieben wird. Die so erhaltene Kinaselösung enthält ereptische Enzyme, ist aber rein genug, um bei den gewöhnlichen Trypsinbestimmungen (Bestimmungszeit 20 Minuten) als Aktivator zu dienen.

Es gelingt in vielen Fällen, die Beimengungen an ereptischen Enzymen, die die Rohkinaselösungen enthalten, durch eine längere Einwirkung von verdünnter Essigsäure zu zerstören. 100 ccm der Rohkinaselösung werden mit 5 ccm n-Essigsäure gefällt und der entstandene Niederschlag nach etwa zweistündigem Stehen abzentrifugiert. Die klare Lösung wird dann neutralisiert.

Fällt die Prüfung auf Erepsin nach dieser Operation noch positiv aus, so wird das Erepsin durch Vergiftung mit Sublimat entfernt. 250 ccm der Mutterlauge von der Essigsäurefällung werden sofort mit 10 ccm 1%iger Quecksilberchloridlösung gefällt und zentrifugiert. Der Überschuß an Quecksilbersalz wird nun durch Einleiten von Schwefelwasserstoff niedergeschlagen, das Quecksilbersulfid, das häufig kolloid ausfällt, über eine Kieselschicht abfiltriert. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wird im FAUST-HEIMschen Abdampfapparat bis zum Verschwinden der Nitroprussidreaktion entfernt. Man neutralisiert sodann mit n-Natronlauge.

Eine Kinaselösung wird auf Freiheit von ereptischen Enzymen geprüft, indem man 5 ccm der Lösung unter den Bedingungen der Dipeptidase- und der Polypeptidase-Bestimmung während 20 Stunden auf Leucylglycin bzw. auf Leucyldiglycin einwirken läßt.

### c) Gewinnung und Reinigung des Pepsins.

Das Pepsin, das bei stark saurer Reaktion wirkende proteolytische Ferment des Magens, spaltet alle genuinen Proteine bis zu Proteosen und Peptonen; auch Serum und Eialbumin, die von tryptischer Proteinase nur schwer angegriffen werden, werden von Pepsin rasch hydrolisiert.

Darstellung nach PEKELHARING<sup>1</sup>. Das Verfahren von C. A. PEKELHARING beruht im wesentlichen auf der verschiedenen Löslichkeit einer pepsinreichen Eiweißfraktion der Magenschleimhaut in verschiedenen Säurekonzentrationen; sie löst sich in Salzsäure von 0,1% und höherer Konzentration, ist aber in 0,02%iger Salzsäure fast vollständig unlöslich. Das Umfällen erfolgt durch Dialyse.

Aus dem frischen, zerkleinerten Fundusteil der Magenschleimhaut von 10 Schweinen wird durch 5tägiges Digerieren bei 37° mit 6 Liter 0,5%iger Salzsäure ein Auszug bereitet, der filtriert wird. In diesem Extrakt wird durch Dialyse (24 Stunden strömendes Leitungswasser) ein pepsinreicher Niederschlag erzeugt, der abzentrifugiert und erneut in 0,2%iger Salzsäure (während einer Stunde bei 37°) gelöst wird. Nach dem Filtrieren wird diese Lösung dialysiert (15—20 Stunden) und so das Pepsin ausgefällt. Diese Manipulation wird noch mindestens einmal wiederholt und der Niederschlag dann abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen, zwischen Filtrierpapier abgepreßt und im Exsiccator getrocknet.

Da bei der Dialyse des Rohextraktes ein beträchtlicher Teil in Lösung bleibt, wird aus der Mutterlauge der ersten Fällung ein Anteil des Pepsins mit basischen Bleiacetat und Ammoniak gefällt. Der voluminöse Niederschlag wird filtriert und aus ihm mit gesättigter Oxalsäurelösung ein gelbbrauner Extrakt gewonnen, der durch Filtrieren vom Bleioxalat abgetrennt wird. In dieser stark sauren Flüssigkeit wird durch Dialysieren gegen strömendes Leitungswasser ein Niederschlag erzeugt (24—36 Stunden), dessen weitere Reinigung durch Lösen in 0,2%iger Salzsäure und Dialyse erfolgt, wie oben beschrieben.

Auch aus der oxalsauren Lösung wird durch Dialyse nur ein Teil des Pepsins ausgefällt; der in Lösung gebliebene Anteil kann entweder durch vorsichtiges Neutralisieren mit Lauge oder durch Sättigen mit Ammoniumsulfat niedergeschlagen werden. Während sich durch Neutralisieren ein gut absitzender Niederschlag bildet, scheiden sich beim Sättigen mit Ammoniumsulfat klebrige, doch leicht zu filtrierende Flocken aus, die feucht, ohne Wasserzusatz, 24 Stunden dialysiert und dadurch gelöst werden. Diese Lösung wird mit 0,02%iger

<sup>1</sup> C. A. PEKELHARING: Zeitschr. physiol. Chem. 1897, 22, 233; 1902, 35, 8.

Salzsäure gefällt und dann 1 Tag gegen 0,02%ige Salzsäure dialysiert. Die weitere Reinigung erfolgt wie bei den anderen Fraktionen. Man gewinnt aus der Schleimhaut von 10 Schweinemägen auf diese Weise 150—200 mg Trockenpräparat.

Darstellung nach O. HAMMARSTEN<sup>1</sup>. Aus dem sauren Auszug der Magenschleimhaut wird die fermenthaltige Fraktion durch Halbsättigung mit Natriumchlorid ausgeschieden, die Fällung abgepreßt, in Salzsäure von 0,2% gelöst das klare Filtrat mit gesättigter Natriumchloridlösung gefällt, wieder in Säure gelöst und sofort gefällt; die zuletzt erhaltene saure Lösung wird durch Dialyse gegen destilliertes Wasser von Salz und Säure befreit, wobei sich das Pepsin ausscheidet; es wird nach dem Zentrifugieren auf Filtern gesammelt und getrocknet.

Ausführung. Man verarbeitet die Magen von Schwein, Kuh oder Hund. Der Pylorusteil wird immer abgetrennt, vom Schweinemagen verwendet man nur die mittlere dunklere Partie. Die Schleimhaut wird abpräpariert oder mit dem Uhrglas abgeschabt, in der Fleischmühle zerkleinert und mit 10 Gewichtsteilen 0,2% Salzsäure während 2—3 Tagen bei 8 bis 10° unter mehrmaligem Umschütteln digeriert. Die nun folgende Filtration dauert lange und muß solange durch Rückgießen auf das Filter wiederholt werden, bis das Filtrat klar abläuft.

Durch Halbsättigung mit feingepulvertem Natriumchlorid scheidet sich eine pepsinreiche Masse ab, die sich regelmäßig an der Oberfläche als scharf begrenzte Schicht absetzt; die untere Schicht wird abgetrennt, die ausgefällte Masse dann zwischen Filtrierpapier stark abgepreßt und nach dem Zerkleinern in 0,2%iger Salzsäure gelöst (für die Fällung aus 1 Liter Rohauszug werden 150—200 ccm Säure angewendet). Die klar filtrierte Lösung wird mit gesättigter Natriumchloridlösung gegen destilliertes Wasser dialysiert, wodurch ein gequollener Niederschlag ausfällt, der abgepreßt und im Exsiccator getrocknet eine spröde, hornartige Masse bildet.

Darstellung krystallisierten Pepsins nach J. H. NORTHPROP<sup>2</sup>. 500 g Parke, Davis Pepsin U.S.P. 1:10000 werden in 500 ccm Wasser gelöst und hierauf 500 ccm n-Schwefelsäure hinzugefügt. Diese Lösung versetzt man unter Umrühren mit 1000 ccm gesättigter Magnesiumsulfatlösung. Der Niederschlag wird durch Absaugen von der Lösung getrennt, zweimal mit dem nämlichen Volumen  $\frac{2}{3}$  gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen und mit Wasser zu einem dicken Brei angerührt. Dazu fügt man unter sorgfältiger Vermeidung eines örtlichen Überschusses 0,5 m Natronlauge bis zur vollkommenen Lösung. Das  $p_H$  darf nicht über 5,0 steigen. Man fällt hierauf mit 0,5 m Schwefelsäure unter Umrühren, bis kein weiterer Niederschlag entsteht ( $p_H = 3,0$ ), läßt bei 8° 3—6 Stunden stehen und saugt ab. Den Niederschlag verrührt man von neuem mit Wasser zu einem dicken Brei und löst ihn bei einer Temperatur von 45° mit 0,5 m Natronlauge sorgfältig auf; vom Ungelösten wird abfiltriert. Hierauf stellt man das Gefäß mit dem Filtrat in einen größeren Filtrierstutzen, der etwa 4 Liter Wasser von 45° enthält, impft wenn möglich und läßt dann die Flüssigkeit langsam erkalten. Nach 3—4 Stunden bildet sich bei einer Temperatur von 30—35° ein krystallisierter Niederschlag, der sich beim Stehen (24 Stunden) bei 20° beträchtlich vermehrt. Er wird abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser, hierauf mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen und, suspendiert in Magnesiumsulfatlösung, bei niedriger Temperatur aufbewahrt. Aus dem Filtrat kann man durch Fällung mit 0,5 m Schwefelsäure bis zum  $p_H = 3,0$  nochmals einen amorphen Niederschlag gewinnen, der auf beschriebener Weise zum Krystallisieren gebracht werden kann.

Der krystalline Niederschlag kann umkrystallisiert werden. Zu diesem Zwecke bringt man den Krystallbrei auf ein Filter und wäscht ihn 3mal mit 0,002 n-Salzsäure aus, verrührt ihn hierauf mit der Hälfte seines Gewichtes an Wasser, erwärmt die Suspension auf 45° und fügt langsam unter ständigem Umrühren 0,5 m Natronlauge hinzu, bis sich der Niederschlag löst ( $p_H = 5,0$ ). Nun versetzt man mit 0,5 m Schwefelsäure, bis die Lösung sich zu trüben beginnt, impft mit einigen Krystallen und läßt nun ganz langsam erkalten. In 24 Stunden scheidet sich ein großer Teil krystallin ab. Das Filtrat wird abermals erwärmt und Schwefelsäure zugefügt, bis das  $p_H$  der Suspension etwa 3,0 beträgt. Nach abermaligen langsamen Erkalten werden die Krystalle isoliert und mit 0,002 m Salzsäure gewaschen.

Eine andere Methode zur Umkrystallisation besteht darin, daß man die Krystalle in Natronlauge bei 45° löst und wie bei der ursprünglichen Darstellung wieder zum Krystallisieren bringt.

<sup>1</sup> O. HAMMARSTEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1915, **94**, 291; 1919, **108**, 243.

<sup>2</sup> J. H. NORTHPROP: Journ. of gen. Physiol. 1930, **13**, 739 u. 767.



Die Abscheidung des Pepsins in krystallisierter Form bedeutet etwa eine 5malige Steigerung der enzymatischen Konzentration. Ein weiteres Umkrystallisieren erhöht die enzymatische Konzentration nicht. Das krystalline Produkt zeigt positive Eiweißreaktionen, die Reaktion nach MOLISCH fällt negativ aus.

Gewinnung von Labpräparaten (Chymosin). Als Lab wird das Ferment bezeichnet, das Milch oder calciumhaltige Caseinlösung zur Gerinnung bringt. Die Frage nach der Identität von Pepsin und Lab ist noch strittig. Hochgereinigte Pepsinpräparate, z. B. das krystallisierte Pepsin nach NORTHROP, zeigen auch starke Labwirkung. Andererseits gelang es HAMMARSTEN sowohl Lab, das keine Pepsinwirkung als auch Pepsinpräparate, die keine labende Wirkung zeigten, aus Kälbermagen zu isolieren.

Im folgenden werden diese Methoden zur Gewinnung von pepsinfreier Lablösung und von chymosinfreier Pepsinlösung beschrieben.

Darstellung pepsinfreier Chymosinlösung nach HAMMARSTEN<sup>1</sup>. Labmägen von Saugkälbern werden vom Darm und von den drei anderen Mägen getrennt, aufgeschnitten und gründlich gespült. Der Pylorusteil wird entfernt. Nach gründlichem Abspülen der Schleimhaut mit Leitungswasser wird die Drüsenschicht mit einem Uhrglas abgeschabt. Ein Teil der Drüsenmasse wird mit 10 Teilen 0,2%iger Salzsäure 12—24 Stunden bei einer etwas über 0° liegenden Temperatur unter häufigen Umschütteln digeriert. Danach wird filtriert; 100 ccm des Auszuges werden mit etwa 1 g Magnesiumcarbonat versetzt und einige Minuten geschüttelt. Dann wird rasch filtriert und auf Pepsin und Chymosin geprüft; die Behandlung des Filtrates mit Magnesiumcarbonat wiederholt man solange, bis dasselbe nur noch sehr schwach auf Fibrin wirkt, dagegen kräftig Milch koaguliert. Gewöhnlich erreicht man dieses Resultat nach dreimaliger Behandlung mit Magnesiumcarbonat in weniger als 1½ Stunden. Koaguliert vom letzten Filtrat 1 ccm unverdünnt (oder halbverdünnt mit Wasser) bei 38° in 1 Minute eine Caseinlösung, während Fibrin nach einer Stunde zwar stark gequollen, aber sonst kaum angegriffen ist, so ist das Filtrat für die weitere Behandlung brauchbar.

Nun wird das Filtrat schwach angesäuert, mit einer Lösung von Cholesterin in Alkohol und etwas Äther rasch vermischt und kräftig geschüttelt. Man sammelt das Cholesterin auf einen Filter, wäscht mit Wasser, schlemmt das Cholesterin sehr fein in wenig Wasser auf, setzt Äther hinzu und schüttelt schwach. Die untere wäßrige Lösung wird rasch von der oberen ätherischen Cholesterinlösung getrennt und in eine große flache Schale hineinfiltrierte, damit das Verdunsten des Äthers erleichtert wird. Eine solche Lösung koaguliert Milch im Verhältnis 1:5 in 5 Minuten oder weniger, während sie bei Gegenwart von 0,2%iger Salzsäure gekochtes Fibrin im Laufe von 12 Stunden bei Körpertemperatur nicht merkbar verdaut.

Für Darstellung chymosinfreier Pepsinlösung gibt HAMMARSTEN an, daß man die saure Enzymlösung bei 40° oder einer höheren Temperatur erwärmen soll. Das Kälberchymosin wird hierbei rascher als das Pepsin zerstört, man erhält daher nach einiger Zeit eine Lösung, die nicht mehr labend wirkt, während sie Eiweiß verdaut.

### 3. Gewinnung und Isolierung der Proteasen der tierischen Organe und Gewebe.

#### a) Proteolytische Enzyme der Organe. Leber, Milz, Speicheldrüse.

Als Träger der proteolytischen und autolytischen Prozesse in den Organen und Geweben fungieren vier verschiedene Enzyme, eine Proteinase, Kathepsin genannt, vom Typus pflanzlicher Proteinase z. B. des Papains, zwei Polypeptidasen, deren eine, eine Carboxy-Polypeptidase, mit den freien Carboxylgruppen in den Polypeptiden, deren andere, eine Amino-Polypeptidase, mit den freien Aminogruppen in Reaktion tritt, und endlich eine Dipeptidase.

<sup>1</sup> O. HAMMARSTEN: Zeitschr. Physiol. Chem. 1908, 56, 18; 1911, 74, 142; 1915, 94, 104; 1922, 121, 240 u. 261; 1923, 130, 55.

**α) Darstellung von Organauszügen<sup>1</sup>.** Die Gewinnung proteolytisch wirksamer Auszüge aus Organen, wie Leber, Milz, Niere usw. erreicht man am besten durch Extraktion mit Glycerin; Glycerin stabilisiert und die Extraktion damit ist auswählender. Man kann die Extraktion mit frischen, zerkleinerten Organen ausführen, indem man den Organbrei mit dem doppelten Volumen 87% Glycerin innig verrührt, das Gemisch mehrere Stunden bis zu einem Tage stehen läßt und dann durch Faltenfilter filtriert, oder aber man kann die zerkleinerten Organe mit Aceton und Äther nach dem für Pankreasdrüsen auf S. 720 beschriebenen Verfahren trocknen und das getrocknete, gepulverte und gesiebte Organ im Verhältnis 1:10 mit Glycerin verrühren und nach eintägigem Stehen filtrieren. Man gelangt auf letzterem Wege zu einem klaren verhältnismäßig wenig Verunreinigungen enthaltenden Extrakt, in dem die proteolytischen Enzyme äußerst haltbar sind. Nur muß man berücksichtigen, daß bei diesem Verfahren der in wäßrigem Aceton lösliche Aktivator ganz oder teilweise abgetrennt wird (vgl. Darstellung der Zookinase s. unten).

**β) Trennung der Organproteasen.** Die Isolierung der ereptischen Enzyme, der Dipeptidase und der Aminopolypeptidase, von den katheptischen Enzymen, der Proteinase und Carboxy-Polypeptidase, erreicht man nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern<sup>1</sup> verhältnismäßig leicht durch Adsorption der ereptischen Enzyme an Tonerde C $\gamma$  bei saurer Reaktion und Elution des Adsorbates mit Ammoniak oder Phosphat. Auch die Isolierung der Amino-Polypeptidase aus dem verbleibenden Gemisch mit Dipeptidase ist durchgeführt worden. Auch hier wirkt Eisenhydroxyd bei saurer Reaktion als spezifischeres Adsorbens für das dipeptidspaltende Enzym; in den Restlösungen der Eisenadsorption findet sich die Polypeptidase nahezu frei von Dipeptidase. Die Ausschaltung auch der letzten Anteile Dipeptidase läßt sich leicht durch z. B. 14stündiges Stehenlassen bei  $p_H = 4,0$  erreichen; dabei tritt vollständige Inaktivierung der Dipeptidase ein, während die Polypeptidase den größten Teil ihrer Wirkung beibehält.

Die Ausführung der Trennung schließt sich eng an die bei den Darmenzymen gegebenen Vorschriften an, so daß auf eine Wiedergabe von Einzelheiten der Ausführung verzichtet werden kann; im übrigen sei auf die Originalarbeit verwiesen<sup>1</sup>.

Isolierung der katheptischen Enzyme. Ihre Gewinnung frei von ereptischen Wirkungen ist durch den Umstand erschwert, daß die Menge der katheptischen Enzyme in den Organen und ihren Auszügen, verglichen mit der der ereptischen, nur geringfügig ist. Während die ereptischen Enzyme in einer Konzentration vorliegen, die der in der Darmschleimhaut nicht sehr nachsteht, ist die Konzentration der katheptischen Enzyme so klein, daß man zu ihrer Bestimmung große Enzymmengen, z. B. 2 ccm Glycerinextrakt und lange Zeiten (24 Stunden) wählen muß. Eine Trennung mit Hilfe von Adsorptionsmitteln ist deshalb nicht möglich; man kann indes die Wirkung der ereptischen Enzyme durch Gifte vollkommen ausschalten. Die Wirkung der Aminopolypeptidase und der Dipeptidase wird durch Schwefelwasserstoff und durch Quecksilberchlorid fast vollständig, durch Blausäure vollständig und irreversibel unterbunden. Weder Blausäure noch Schwefelwasserstoff schädigen die katheptischen Enzyme, vielmehr fungieren sie als Aktivatoren dieser Enzyme (vgl. S. 755).

Ausführung der Vergiftung. Glycerinauszug aus frischer Milz wird der 3stündigen Einwirkung von  $\frac{1}{5}$  seines Volumens 5%iger Kaliumcyanidlösung, die mit n-Salzsäure neutralisiert ist, unterworfen. Nach Ablauf der Einwirkungszeit wird die Lösung mit n-Essigsäure auf  $p_H = 4,0$  gebracht und durch mehrstündiges Durchleiten von Luft die Blausäure verjagt. Schäumen kann durch Zugabe einiger Tropfen Oktylalkohol vermieden werden.

Die hierauf durchzuführenden Enzymbestimmungen werden nach den Vorschriften S. 755 ausgeführt. Man verwendet zur Bestimmung der katheptischen Enzyme eine Analysenprobe entsprechend 2,0 ccm Glycerinauszug; nach maximaler Aktivierung mit Schwefelwasserstoff läßt man das Enzym 24 Stunden auf Gelatine einwirken. Für die Prüfung auf Freiheit von ereptischen Enzymen wendet man ebenfalls eine Einwirkungsdauer von 24 Stunden und eine Enzymmenge entsprechend 0,5 ccm Glycerinauszug an.

**γ) Darstellung von Zookinase.** Für die Darstellung des Aktivators empfiehlt es sich nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>2</sup>, die zerkleinerten Organe (Leber, Milz) einer etwa 4stündigen Autolyse zu überlassen, da dabei der Gehalt der Organe an Zookinase beträchtlich zunimmt. Die Abtrennung des Aktivators beruht auf seiner Löslichkeit in wasserhaltigem Alkohol oder Aceton. Bei der Extraktion der zerkleinerten Organe mit diesen Lösungsmitteln verbleiben die katheptischen Enzyme in den mittels Äther getrockneten Extraktionsrückständen in aktivatorfreier Form. Aus den alkoholischen Auszügen wird der Aktivator durch Zusatz von Äther gefällt.

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. SCHÄFFNER, J. J. BEK u. E. BLUM: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 17.

<sup>2</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 198, 260.

Ausführung. 750 g zerkleinerte Schweineleber schüttelt man nach 4stündigem Stehen mit 1500 ccm 96%igen Alkohol (Alkoholkonzentration entsprechend 70%) während einer halben Stunde gut durch und saugt den alkoholischen Extrakt auf der Nutsche vom Ungelösten ab. Der Extraktionsrückstand wird wiederum mit 1500 ccm 70%igen Alkohol wie oben behandelt. Der Rückstand wird mit Alkohol und Äther weiter getrocknet. Durch Extraktion des Trockenpulvers gewinnt man durch Behandlung mit Glycerin im Verhältnis 1:10 haltbare und inaktive Glycerinextrakte. Die beiden Alkoholextrakte werden vereinigt und nach dem Einengen im Vakuum auf etwa 200 ccm mit dem doppelten Volumen Äther ein Öl gefällt, von dem abgossen wird und das im Vakuum zu einem leichtzerfließlichen Trockenprodukt eingedampft werden kann. In diesem Trockenpräparat ist die Zookinase enthalten. Aus 750 g Leber erhält man etwa 12 g dieses Rohpräparates mit 106 Zookinaseeinheiten.

Die Zookinase menge kann in den Rohlösungen durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff sehr erheblich gesteigert werden. Diese Zunahme an Aktivität beruht auf der Überführung der in den Präparaten vorhandenen Disulfidverbindung in die allein wirksame Sulfhydrylform. Der Schwefelwasserstoff muß vor der Bestimmung der Zookinase quantitativ im Wasserstoffstrom verjagt werden. Die weitere Reinigung der Zookinase schließt sich an das von HOPKINS<sup>1</sup> beschriebene Verfahren zur Gewinnung des Glutathions aus Leber an.

### b) Proteolytische Enzyme des Blutes.

Nach Beobachtungen von W. GRASSMAN<sup>2</sup> enthält das normale Blutserum eine Dipeptidase in relativ geringer Konzentration, und eine Amino-Polypeptidase in erheblichen Mengen. Carboxy-Polypeptidasewirkung kann im Blutserum nicht nachgewiesen werden. Es ist für die Ausbeute an Enzym gleichgültig, auf welche Art man das Serum gewinnt, ob man das Blut unmittelbar im Zentrifugenglas auffängt und sofort zentrifugiert, oder ob man erst nach der Gerinnung des Blutes zentrifugiert.

Zur Bestimmung der Peptidasen eignen sich die S. 749 angegebenen Methoden, nur stellt man das  $p_H$  der Versuchsflüssigkeit im Falle der Polypeptidase auf  $p_H = 7,4$ , das Optimum der Blutpolypeptidase, ein. Der Gehalt des Blutserums an Peptidasen wechselt von einer Tierart zur anderen erheblich und charakteristisch. Das Serum des Rindes erweist sich als 2–3mal, das des Schweines als etwa 10mal so wirksam als das des Menschen. Für die Bestimmung werden 1–2 ccm Serum verwendet, die Bestimmungszeiten wählt man so, daß meßbare Ausschläge zu erwarten sind (etwa 2–4 Stunden).

Vielgestaltiger sind die proteolytischen Enzyme in den weißen Blutkörperchen. Nach R. WILLSTÄTTER<sup>3</sup> sind in den Leukocyten, abgesehen von den ereptischen Enzymen, zwei Proteinase — die tryptische und die katheptische Proteinase, sowie in geringer Konzentration eine Carboxy-Polypeptidase enthalten.

Die farblosen Blutkörperchen lassen sich entweder aus frischem Blut durch fraktioniertes Sedimentieren nach dem Verfahren von HEKMA und J. HAMBURGER<sup>4</sup> oder aus defibriiertem Blut durch fraktionierte Zellauflösung nach SZILARD<sup>5</sup> gewinnen. Zur enzymatischen Analyse dient das Leukocytensediment entweder ganz frisch oder meistens aufbewahrt als Suspension in 86%igen Glycerin.

Eine Trennung des proteolytischen Systems der Leukocyten ist bisher nicht vorgenommen. Man führt die Bestimmung der Proteinase bei verschiedenem  $p_H$  (4–8,5) mit Casein als Substrat aus, ähnlich der auf S. 752 beschriebenen Bestimmung der tryptischen Proteinase. Eine Aktivierung mit Enterokinase

<sup>1</sup> F. G. HOPKINS: Journ. of biol. Chem. 1929, 84, 269; vgl. auch E. C. KENDALL und Mitarbeiter: Journ. of biol. Chem. 1929, 84, 657.

<sup>2</sup> W. GRASSMANN u. W. HEYDE: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 69.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER, E. BAMANN u. M. ROHDEWALD: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 107.

<sup>4</sup> E. HEKMA u. J. HAMBURGER: Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 9, 1 (1919).

<sup>5</sup> P. SZILARD: Pflügers Archiv 1925, 211, 597.

bzw. mit Blausäure ist überflüssig; die Enzyme liegen offenbar in maximal aktivierter Form vor.

Eine Titrationsprobe von 5 ccm enthält nach R. WILLSTÄTTER 0,12 g Casein, 0,5 ccm Pufferlösung (im alkalischen Gebiet n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, im sauren Gebiet Citratpuffer<sup>1</sup>) und eine Enzymmenge, entsprechend 10—30 mg Leukocyten; die Einwirkungszeiten liegen zwischen 6—48 Stunden. Die Titration wird ausgeführt mit 0,05 n-Kalilauge in alkoholischer Lösung. So bewirkte z. B. eine Glycerinsuspension von 10,5 mg Leukocyten-Trockengewicht bei  $p_H = 8,0$  in 27 Stunden eine Caseinhydrolyse entsprechend 0,75 ccm 0,05 n-Kalilauge.

Zur Bestimmung der Peptidasewirkung benutzt man die Einwirkung auf Leucylglycin bzw. auf Leucyldiglycin unter geringer Abänderung der für die ereptischen Enzyme des Darmes gegebenen Vorschriften. Z. B. ergibt eine Titrationsprobe von 5 ccm, die 0,0612 g Leucyldiglycin =  $\frac{1}{4000}$  Mol. und eine Glycerinsuspension entsprechend 22,2 mg Leukocyten enthält und auf ein  $p_H = 7,2$  eingestellt ist, in 2 Stunden einen Aciditätszuwachs von 0,45, in 4 Stunden von 1,00 ccm 0,05 n-Kalilauge in alkoholischer Lösung.

### c) Blutgerinnung.

Die Blutgerinnung wird hervorgerufen durch die Umwandlung des Fibrinogens eines Bestandteiles des strömenden Blutes, in das unlösliche Fibrin, das ausflockt und je nach der Konzentration einen festen Blutkuchen oder ein lockeres Gerinnsel bildet. Diese Umwandlung beruht auf einen fermentativen Prozeß; das Thrombin, aktiviert durch Thrombokinasen, bewirkt diese Ausscheidung. Diese Anschauung ist nicht unwidersprochen; Erklärungsversuche der Blutgerinnung nach rein oder überwiegend chemischen Gesichtspunkten stehen dem gegenüber. Vgl. dazu B. STUBER<sup>2</sup>.

Für die Bestimmung der Blutgerinnung verfügt man noch nicht über eine zuverlässige quantitative Methode; denn man mißt die Wirkung des Thrombins noch nicht, wie die anderer proteolytischer Enzyme, auf Grund chemischer Veränderungen seines Substrates, sondern man begnügt sich mit der Ausflockung des Fibrinogens, sei es im Blute selbst, sei es in isolierter Form. Das Arbeiten mit den isolierten Fibrinogen hat den Nachteil, daß man es dabei mit größter Wahrscheinlichkeit nicht mehr mit dem nativen Fibrinogen des strömenden Blutes zu tun hat. So erscheint zur Bestimmung der Gerinnungsdauer die Beobachtung der Gerinnung im Blute selbst als die sicherste und einfachste Methode, wengleich auch sie nicht frei von unvermeidlichen Fehlern ist, da die Festsetzung des Gerinnungspunktes willkürlich, der Gerinnungseintritt abhängig von Temperatur und von der Vorbehandlung des Blutes (Berührung mit Fremdkörpern, Kohlensäuregehalt, Vermischung des Blutes mit Gewebssaft) ist.

Von den zahlreichen Methoden, die zur Messung der Blutgerinnung verwendet werden, können hier nur einige wenige in ihrem Prinzip beschrieben werden.

Eine Methode nach HEUBNER und RONA<sup>3</sup> mißt die Gerinnungszeit, an der Ausflußgeschwindigkeit des Blutes aus einer eigens konstruierten Pipette mit sehr engen Ausfluß. Man beobachtet das Abtropfen des Blutes, das in regelmäßigen Intervallen von einigen Sekunden erfolgt. Werden die Intervalle länger, so verschärft man die Aufmerksamkeit, indem man den Fall jedes einzelnen Tropfens mit der bereitliegenden Uhr vergleicht; wenn eine Minute lang kein Tropfen mehr gefallen ist, so kann man abbrechen und den Augenblick des letzten Tropfenfalles als Endpunkt der Gerinnungszeit notieren.

Bei der Methode von WÖHLISCH und PIERITZ<sup>4</sup> wird die Zeit bestimmt, die bis zum Auftreten einer flockigen Trübung im hämolysierten Blut verstreicht; sie erfordert keine besondere Apparatur.

Man bedarf eines kleinen Wasserbades, eines kleinen in das Wasserbad passenden, metallenen Reagensglasständers, einiger Reagensgläser, Glasstäbe, eines Thermometers

<sup>1</sup> In der Nähe des isoelektrischen Punktes ( $p_H = 5$ ) ist eine Ausflockung des Caseins nicht ganz zu vermeiden; die Verwendung von Casein ist aber doch vorteilhafter als die von Gelatine.

<sup>2</sup> Vgl. dazu B. STUBER: Biochem. Zeitschr. 1925, 157, 156.

<sup>3</sup> P. RONA: Biochem. Zeitschr. 1922, 130, 463.

<sup>4</sup> WÖHLISCH u. PIERITZ: Zeitschr. ges. exper. Med. 1922, 27, 82.

und einer möglichst hellen Lampe. Die Gläser werden mit gleichen Volumen destillierten Wassers gefüllt und zum Temperatenausgleich in das auf eine bestimmte Temperatur gebrachte Wasserbad gestellt. Dann entnimmt man durch Punktion aus der Armvene Blut und gibt in jedes der Gläser durch Abzählen der Tropfen, wobei streng auf die gleiche Haltung der Nadel zu achten ist, die gleiche Menge Blut. Nach dem Einspritzen des Blutes nimmt man je zwei Gläser zusammen aus dem Wasserbad, hält sie zur Beobachtung gegen die Lichtquelle und vermischt durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen eines Stempels das Blut mit dem Wasser, bis eine gleichmäßige rote Lösung entstanden ist. Man stellt die Gläser in das Wasserbad zurück und notiert den Zeitpunkt des Versuchsbeginnes. Jede Minute beobachtet man das Blut vor der Lichtquelle unter zweimaligem langsamen Auf- und Abbewegen des Rührers (Glasstäbe von etwa 15 cm Länge und 4 mm Dicke, deren unteres Ende stempelartig zu etwa 8 mm Durchmesser auseinandergedrückt ist). Das Rühren soll gleichmäßig oft in derselben Weise vorgenommen werden. Der Beginn der Trübung verrät sich durch das plötzliche Auftreten einer feinen Trübung. Der Eintritt der Gerinnung läßt sich bei Zusatz von Serum genau ebenso scharf bestimmen, wie bei dem Versuch ohne Serumzusatz.

E. WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>1</sup> und Mitarbeiter nehmen als Kriterium für das Eintreten der Gerinnung des Blutes seine völlige Erstarrung. Graduierte Reagenzgläser von 5 cm Inhalt, in denen sich 1 ccm physiologische Kochsalzlösung, evtl. mit den zu untersuchenden Zusätzen befindet, werden im Thermostaten auf 37° vorgewärmt. Hierauf wird der Inhalt der Reagenzgläser mit 4,0 ccm mittels Kanüle frisch aus der Halsvene einer Ziege entnommenen Blutes durch einmaliges rasches Umschwenken vermischt; man mißt dann an den in den Thermostaten verbrachten Proben die bis zur völligen Erstarrung der Mischung erforderliche Zeit.

K. BÜRCKER<sup>2</sup> beschreibt eine Methode, die die Gerinnungszeit des Blutes mit Hilfe ganz kleiner Mengen Blutes (1 Tropfen) zu bestimmen erlaubt. Vgl. dazu die Originalarbeit.

Bei der Thrombinbestimmung nach WOHLGEMUTH<sup>3</sup> verwendet man isoliertes Fibrinogen. Absteigende Mengen Fibrinogen (frisches Serum) werden mit gleichen Mengen Fibrinogen zusammengebracht und die kleinste Menge Ferment ermittelt, die noch imstande ist, in der Fibrinogenlösung ein Gerinnsel zu erzeugen.

Als Fibrinogenlösung dient Magnesiumsulfatplasma, das so bereitet wird, daß man 3 Teile frisches Blut mit 1 Teil Magnesiumsulfatlösung (28%) mischt, tüchtig durchschüttelt und durch scharfes Zentrifugieren das Plasma von den Blutkörperchen trennt. Dieses Plasma hält sich im Eisschrank wochenlang, ohne seinen Gehalt an Fibrinogen wesentlich zu ändern. Zu dem Versuch wird eine 10fache Verdünnung desselben verwendet, die man sich für jeden Versuch unter Benutzung von 1%iger Natriumchloridlösung frisch aus dem Plasma bereiten muß.

Eine Reihe von Reagenzgläsern wird mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Thrombinlösung beschickt, und zwar in der Weise, daß man in das erste Glas 1,0 ccm, in das zweite 0,5 ccm, in das dritte 0,25 ccm usw. bringt und das für die hierbei notwendigen Verdünnungen ausschließlich 1%ige Kochsalzlösung verwendet wird. Hiernach werden je 2 ccm der verdünnten Fibrinogenlösung zu jedem Glas zugefügt; nach dem Durchschütteln werden die Proben auf 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Nach Ablauf der Frist nimmt man die Gläser aus dem Eisschrank heraus und stellt nun, ohne zu schütteln, durch vorsichtiges horizontales Neigen eines jeden Röhrchens fest, wo eine Gerinnung stattgefunden hat.

Gewinnung von Fibrinogenlösung nach HAMMARSTEN<sup>4</sup>. Zur Gewinnung ist Pferdeplasma am geeignetsten; das Blut wird in Natriumoxalatlösung aufgefangen (die Konzentration des Salzes in Blut soll 0,2—0,5% betragen). Das Blut wird scharf abzentrifugiert, das abgehobene, völlig zellfreie Plasma auf 0° abgekühlt und bei niedriger Temperatur filtriert. Das Plasma bleibt bei 0° eine Nacht stehen, wobei ein nucleoproteidhaltiger Niederschlag ausfällt, der Proferment enthält und der entfernt wird. Das eiskalte, filtrierte Plasma wird mit wenig verdünnter Essigsäure gegen Lackmus neutralisiert. Dann wird reines Natriumchlorid zugesetzt, bis die Flüssigkeit ein spezifisches Gewicht von 1,10 angenommen hat (Halbsättigung). Das Fibrinogen fällt hierbei in großen, sich zusammenballenden Flocken aus. Diese können leicht aus dem Plasma in eine dem Plasma gleiche Menge destillierten Wassers eingetragen werden. Das destillierte Wasser soll eine Spur Natriumoxalat, etwas -chlorid und 5 ccm einer gesättigten Natriumcarbonatlösung enthalten. Man nimmt also — namentlich beim Rinderplasma — die Fällung des Fibrinogens

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, P. STADLER u. F. STEIGERWALDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, 183, 39.

<sup>2</sup> H. BÜRCKER: Pflügers Archiv 1912, 149, 318.

<sup>3</sup> J. WOHLGEMUTH: Fermentmethoden 1913, S. 320; Biochem. Zeitschr. 1910, 25, 79.

<sup>4</sup> O. HAMMARSTEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1896, 22, 333; NOLF: Arch. internat. Physiol. 1908, 6, 3.

stets bei neutraler, die Lösung bei leicht alkalischer Reaktion vor. Die erste Fällung des Fibrinogens löst sich unter Umrühren meist schnell und vollständig. Vom Ungelösten filtriert man ab. Nun wird die klare, leicht alkalische Flüssigkeit durch vorsichtigen Zusatz verdünnter Essigsäure wieder gegen Lackmus neutralisiert. Bildet sich dabei ein leichter, grobflockiger Niederschlag, so ist sie durch Gaze zu filtrieren. Das Filtrat wird abgekühlt und in derselben Weise mit Kochsalz gefällt wie das Plasma. Der zweite Niederschlag kann, wenn er an Masse gegen den ersten zurücksteht, in etwas weniger Wasser übertragen werden. Man fährt in dieser Weise mit Fällen und Lösen des Fibrinogens fort. Doch soll das Wasser, in dem man den dritten Niederschlag auflöst, keinen Oxalatzusatz mehr enthalten. Der vierte Niederschlag wird in einer Wassermenge gelöst, die dem 4. Teil der ursprünglichen Wassermenge entspricht. Dem Wasser hat man vorher (5–6 Tropfen auf 300 ccm) gesättigte Natriumcarbonatlösung zugesetzt. Man fügt noch soviel Natriumchlorid zu, daß die Salzkonzentration ungefähr 1% beträgt. Die Fibrinogenlösung bleibt bis zum nächsten Tage bei 0° stehen und wird durch Leinen kolliert. Aus 1 Liter Plasma erhält man ungefähr 150–500 ccm Fibrinogenlösung. Sie wird zum Versuch mit der 5 bis 10fachen Menge 1%iger Natriumchloridlösung verdünnt. Die Lösungen sollen nur auf Zusatz von Thrombin gerinnen.

Gewinnung des Thrombins. a) Nach SCHMIDT<sup>1</sup>. Man läßt eine bestimmte, nicht zu kleine Blutmenge spontan gerinnen. Sobald das Fibrin abgesetzt ist, wird das Serum mit dem 20fachen Volumen 95%igen Alkohols gefällt. Man kann den Niederschlag solange unter Alkohol aufbewahren, bis man ihn verwenden will. Zum Versuch wird der Alkohol abfiltriert, der Niederschlag zwischen Filtrierpapier ausgepreßt, getrocknet und mit Wasser und physiologischer Natriumchloridlösung extrahiert. Bei kurzer Extraktion geht neben dem Thrombin nur wenig Eiweiß in Lösung.

b) Nach HOWELL<sup>2</sup>. Eine größere, durch Schlagen von Schweineblut gewonnene Fibrinmenge wird in fließendem Wasser bis zur völligen Hämoglobinfreiheit gewaschen. Die weiße Fibrinmasse wird dann möglichst fein verteilt und für 2–3 Tage im Eisschrank mit 8%iger Natriumchloridlösung extrahiert, dann zuerst durch Gaze, später durch Filtrierpapier filtriert. Das etwas trübe, stark thrombinhaltige Filtrat wird zur Entfernung der Eiweißkörper mehrfach tüchtig mit dem halben Volumen Chloroform geschüttelt und filtriert, wobei der Chloroformniederschlag auf dem Filter bleibt. Diese Prozedur, die man mit der Schüttelmaschine vornehmen kann, ist solange fortzusetzen, als das Filtrat noch trübe ist oder beim Kochen eine deutliche Fällung gibt. Endlich gewinnt man eine wasserklare, nahezu eiweißfreie Lösung, die immer noch ziemlich viel Thrombin enthält. Um dieses Thrombin in einen haltbaren Zustand überzuführen, läßt man geringe Mengen (5 bis 10 ccm) bei 35–40° möglichst schnell im Uhrglas eintrocknen. In diesem Zustand hält es sich unbeschränkt. Zum Gebrauch wird das Trockenpulver in physiologischer Natriumchloridlösung gelöst. Das Thrombin wird aus diesen Lösungen durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat niedergeschlagen.

Bereitung von Thrombokinase nach MORAWITZ<sup>3</sup>. Das Gewebe (Thymus, Lymphknoten, Leber) wird sehr sorgfältig entblutet, gereinigt und zerkleinert. Der Organbrei wird mit der gleichen Kochsalzlösung  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{2}$  Stunde in der Maschine geschüttelt, die Mischung mehrere Stunden im Eisschrank aufbewahrt und dekantiert. Die trübe aussehende Natriumchloridlösung wird direkt zu Gerinnungsversuchen verwendet. Sie verliert beim Aufbewahren ihre Wirksamkeit schnell. Die Kinase bedarf zu ihrer Wirkung Calciumionen.

#### 4. Gewinnung und Isolierung pflanzlicher Proteasen.

##### a) Proteolytische Enzyme der Hefe.

Das proteolytische System der Hefe setzt sich aus einer Dipeptidase, einer Polypeptidase und einer Proteinase vom Typus des Papains zusammen. Die Hefeproteinase unterliegt der Aktivierung durch einen in der Hefezelle vorkommenden Aktivator-Glutathion (vgl. W. GRASSMANN<sup>4</sup>), dessen Wirkung durch Cystein, Schwefelwasserstoff oder Blausäure ersetzt werden kann.

Aus dem Zellverband werden die Hefeproteasen am besten durch Autolyse, die man durch schnell wirkende Zellgifte wie Toluol, Chloroform oder Essigester

<sup>1</sup> A. SCHMIDT: „Zur Blutlehre“ 1892; zitiert aus Methodik der Fermente, Abschnitt Blutgerinnung I. v. E. ATZLER, S. 1422.

<sup>2</sup> HOWELL: Amer. Journ. Physiol. 1910, 26, 454.

<sup>3</sup> P. MORAWITZ: Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 4, 3, 43, 190.

<sup>4</sup> W. GRASSMANN, O. v. SCHÖNEBECK u. H. EIBELER: Zeitschr. physiol. Chem. 1930/31, 194, 124.

hervorrufft, freigelegt. Der Erfolg der Autolyse hängt sehr von der Art des Zellgiftes, den Bedingungen unter denen die Autolyse durchgeführt wird und von der Zeitdauer der Autolyse ab.

α) Gewinnung der Hefepolypeptidase und Proteinase durch Autolyse mit Chloroform.

Das Gemisch von Hefepolypeptidase und Hefeproteinase läßt sich nach W. GRASSMANN<sup>1</sup> durch Autolyse in Gegenwart von Chloroform bei alkalischer Reaktion gewinnen. Aus den Autolysaten kann dann die Proteinase und Polypeptidase durch Ansäuern zusammen mit einer großen Menge Proteinsubstanzen niedergeschlagen werden. Einen raschen und weitgehenden Abbau der beigemengten Eiweißstoffe und die gleichzeitige Entfernung der Abbauprodukte erzielt man am einfachsten bei kurzer Dialyse der in wenig Ammoniak gelösten Fällung gegen rasch fließendes Wasser.

Beispiel. 1 kg frische Hefe wird mit 100 ccm Chloroform verflüssigt, mit 1 Liter Wasser und etwas Toluol versetzt, durch Zugabe von 10 %igem Ammoniak auf deutlich alkalische Reaktion (Curcumbraun) gebracht und durch fortlaufenden Zusatz alkalisch erhalten. Nach 48 Stunden wird die Enzymlösung von den Heferückständen abgetrennt. Sie soll frei sein von Dipeptidase und enthält Proteinase (etwa 200 Einheiten in 890 ccm) und Polypeptidase (etwa 800 Einheiten in dem nämlichen Volumen). Nun wird mit soviel 2,5 n-Essigsäure gefällt, daß in einer abfiltrierten Probe Essigsäure keinen Niederschlag mehr hervorruft. Den entstandenen Niederschlag trennt man in der Zentrifuge ab, suspendiert ihn in Wasser und fügt verdünntes Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion hinzu, wobei das proteinspaltende und polypeptidspaltende Enzym, zusammen mit dem größten Teil des Proteinniederschlags, in Lösung geht. Die vom Ungelösten abzentrifugierte Flüssigkeit enthält beide Enzyme in etwa 80 % Ausbeute in einem Volumen von etwa 70 ccm. Die Lösung wird nun in einer Fischblase 68 Stunden gegen Leitungswasser, dann weitere 40 Stunden gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert. Das Volumen der Lösung steigt dabei etwas an (z. B. 100 ccm).

Es werden mit der Lösung folgende Enzymbestimmungen ausgeführt: 0,4 ccm bewirken eine Gelatinehydrolyse z. B. von 1,50 ccm 0,2 n-Kalilauge unter den Bedingungen der Proteinasebestimmung (s. S. 757) in 24 Stunden. 0,2 ccm Enzymlösung spalten 49 mg Leucyldiglycin unter den Bedingungen der Polypeptidasebestimmung (s. S. 752), z. B. entsprechend einem Aciditätszuwachs von 0,80 ccm 0,05 n-Kalilauge in 1 Stunde.

Man kann ein wirksames Trockenpräparat aus dieser Enzymlösung darstellen häufig mit beträchtlichen Aktivitätsverlusten der Polypeptidase, indem man die auf  $\frac{1}{10}$  eingeeengte Enzymlösung in das 10fache Volumen Aceton, das auf  $-15^{\circ}$  abgekühlt sein soll, schüttet und möglichst rasch zentrifugiert. Man wäscht mit kaltem Aceton und dann mit kaltem Äther.

β) Trennung der Hefepolypeptidase und -Proteinase durch fraktionierte Autolyse.

Die Trennung der beiden Enzyme Polypeptidase und Proteinase erreicht man durch fraktionierte Autolyse. Die beiden Enzyme gehen nämlich mit verschiedener Geschwindigkeit bei der Autolyse der Hefe in Lösung über. Die Freilegung der Hefe-Polypeptidase erfolgt bei nicht zu stark saurer oder alkalischer Reaktion mit geringer aber gleichmäßiger Geschwindigkeit im Laufe von einer Woche oder mehr. Die Proteinase dagegen ist schon nach 24, spätestens 48 Stunden völlig in Lösung gegangen.

Zur Gewinnung der proteinasefreien Hefe-Polypeptidase ist es nur nötig, nach Ablauf dieser Zeit den Heferückstand von der Lösung abzutrennen und nach gutem Waschen erneut mit Wasser und Zellgift der Selbstverdauung zu überlassen. Man erhält dann im Laufe der folgenden Tage das Polypeptidspaltende Enzym meist über 30 % der Gesamtmenge, frei von jeder Wirkung gegenüber Proteinen.

<sup>1</sup> W. GRASSMANN u. W. DYCKERHOFF: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 179, 41.

Die Freilegung der Hefeproteinase erfolgt mit einem völlig anderen zeitlichen Verlauf. Zu ihrer Gewinnung trennt man die bei der Autolyse in Gegenwart von Chloroform gebildete Lösung etwa 15 Stunden nach Versuchsbeginn von den Rückständen ab; man findet in ihr wenig, mitunter auch gar kein protein-spaltendes Enzym. Aber in den folgenden Stunden setzt die Freilegung der Proteinase kräftig ein und schon nach etwa 24 Stunden ist sie so gut wie beendet. Das Verhältnis gegenüber dem polypeptidasespaltendem Enzym wird noch günstiger, wenn man den zweiten Teil der Autolyse bei  $p_H = 5$  vor sich gehen läßt. Die Menge des in Lösung gehenden polypeptidspaltenden Enzyms sinkt auf nicht oder kaum nachweisbare Spuren.

Ausführung der fraktionierten Autolyse. 1,5 kg frische Hefe werden mit Chloroform verflüssigt und in 1,5 Liter 0,3%igen Ammoniak suspendiert. Nach 17stündiger Autolyse wurde der Heferückstand in der Zentrifuge abgetrennt, gründlich gewaschen und erneut mit 800 ccm Wasser suspendiert; die Suspension brachte man mit Essigsäure auf  $p_H = 5,0$  und überläßt sie weitere 5 Stunden der Autolyse unter Toluolzusatz. Dann trennt man in der Zentrifuge vom Rückstand ab, und bringt die Lösung zur Ausfällung der aus der Hefe aufgenommenen säurelöslichen anorganischen Phosphate mit Ammoniak kurze Zeit auf alkalische Reaktion ( $p_H = 8,5$ ). Die nach dem Abfiltrieren des Niederschlags erhaltene Lösung wird wieder neutralisiert. Sie ist frei von Dipeptidase und Polypeptidase und enthält beträchtliche Mengen inaktive Proteinase.

Die so gewonnenen Enzymlösungen lassen sich durch Adsorption an Tonerde und Elution mit Diammoniumphosphat konzentrieren und reinigen. 400 ccm der Lösung werden mit Essigsäure auf  $p_H = 5$  gebracht und in Gegenwart von 0,02 m-Essigsäure-Acetat-Puffer der gleichen Reaktion mit einer Suspension von 290 mg C $\gamma$  behandelt. Das Adsorbat eluiert man mit 44 ccm 5%iger Diammonphosphatlösung. Die erhaltene Elution ist frei von Peptidasen. Die Wirkung auf Gelatine soll unter den Bedingungen der Proteinasebestimmung für 1 ccm Enzymlösung in 24 Stunden einen Aciditätszuwachs entsprechend 0,5—1,0 ccm 0,2 n-Kalilauge ergeben.

### $\gamma$ ) Gewinnung von Hefe-Dipeptidase.

Zur Gewinnung der Hefe-Dipeptidase<sup>1</sup> eignen sich nur die durch rasche und fraktionierte Autolyse in Gegenwart von Essigester oder Toluol bei neutraler oder ganz schwach saurerer Reaktion ( $p_H = 6,5-7,0$ ) gewonnenen Enzymlösungen. Sie enthalten Dipeptidase in maximaler Ausbeute; aus den angesäuerten Lösungen wird die Proteinase und die Polypeptidase leicht, die Dipeptidase erheblich schwerer von Tonerde aufgenommen und bei wiederholter Adsorption gelingt es einen Teil des dipeptidspaltenden Enzyms in der Restlösung frei von tryptischer Wirkung zurückzuhalten. In den nach partieller Adsorption erhaltenen Restlösungen ist zwar die Adsorbierbarkeit der Dipeptidase stark gesteigert und es muß demnach gerade die Entfernung der letzten Reste der Proteinase mit starken Verlusten an Dipeptidase erkaufte werden. Für die adsorptive Trennung der Enzyme ist nämlich ein gewisser Gehalt der Enzymlösung an adsorbierbaren Verunreinigungen notwendig. Man erreicht das nämliche Ziel, wenn man das für den Trennungsversuch bestimmte Aluminiumhydroxyd zuerst mit einem Teil der Enzymlösung vorbehandelt und so seine Oberfläche mit den die Adsorption hemmenden Stoffen belädt. So vorbereitete Tonerde adsorbiert die Dipeptidase in der Tat viel weniger, während die Proteinase völlig oder doch nahezu unvermindert von ihr aufgenommen wird.

Ausführung. 500 g frische Hefe werden mit 50 ccm Essigester unter Umrühren rasch verflüssigt, mit Wasser zu einem Volumen von 1 Liter verdünnt und die auftretende Säure fortlaufend mit Ammoniak unter Vermeidung jedes Alkaliüberschusses neutralisiert. Der nach 1½ Stunden abgetrennte Verflüssigungssaft ist gegen Gelatine und Peptid wirkungslos. Der Heferückstand wird mit etwa 2 Litern Wasser gewaschen, von neuem zu einem Volumen von 1 Liter unter Zusatz von Toluol suspendiert und die Enzymlösung nach 22 Stunden vom Versuchsbeginn an isoliert. In 1 ccm einer solchen Lösung wurden in einem Beispiel 3,54 Einheiten der Dipeptidase und 0,31 Einheiten der Proteinase gefunden.

<sup>1</sup> W. GRASSMANN u. W. HAAG: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 167, 188.



400 ccm des erhaltenen Verflüssigungssaftes bringt man mit Essigsäure auf annähernd  $p_H = 5,0$ , fügt 80 ccm 0,5 n-Acetat-Puffer von der gleichen Reaktion hinzu, versetzt mit einer Suspension von 700 mg Tonerde A und ergänzt das Volumen zu 1600 ccm. Das abzentrifugierte Tonerdegel wird im Meßkolben zu einem Volumen von 50 ccm suspendiert (1 ccm = 14 mg  $Al_2O_3$ ).

70 ccm der Enzymlösung (in einem Beispiel 248 Einheiten der Dipeptidase und 21,6 Proteinaseeinheiten enthaltend) bringt man mit 0,60 ccm n-Essigsäure auf annähernd  $p_H = 5,0$  und fügt 6,6 ccm n-Acetatpuffer von der gleichen Reaktion und etwa 170 ccm Wasser hinzu. Nach Zugabe von 6,4 ccm der erhaltenen Tonerdesuspension (90 mg  $Al_2O_3$ ) wird das Volumen zu 250 ccm ergänzt. Nach Abtrennung des Adsorbates in der Zentrifuge wiederholt man die Behandlung mit einer gleichen Menge Tonerde noch viermal rasch und in der Kälte. Die letzte Restlösung war frei von Proteinase und Polypeptidase; 2,5 ccm bewirken unter den üblichen Bedingungen in 24 Stunden keine meßbare Gelatinespaltung. 1,4 ccm Enzymlösung bewirkten in dem oben angeführten Beispiel in 1 Stunde eine Dipeptidspaltung entsprechend 0,98 ccm 0,2 n-Kalilauge. 42% der angewandten Dipeptidase sind in der Restlösung verblieben.

#### δ) Darstellung von Hefemacerationssaft.

Zur Gewinnung von Hefedipeptidase ist, abgesehen von dem nur noch historisch bedeutungsvollen Verfahren von BUCHNER<sup>1</sup>, bei dem durch Auspressen der frischen mit Kieselgur vermengten Hefe in der hydraulischen Presse eine zellfreie Hefepreßsäfte hergestellt wird, die Extraktion von Trockenhefen mit Wasser oder Natriumchloridlösungen (Macerationsverfahren nach LEBEDEV<sup>2</sup> noch brauchbar.

Darstellung eines Macerationssaftes aus Trockenhefe nach ABDERHALDEN und FODOR<sup>3</sup>. Man verrührt die trockene Hefe mit der dreifachen Menge einer 0,6—0,7%igen Natriumchloridlösung, bis Quellung der Masse eingetreten ist und läßt sodann 2 Stunden hindurch im Brutschrank bei 37° stehen. Dabei tritt eine erhebliche Selbstgärung auf. Man läßt nun ungefähr 5—6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, gießt die inzwischen dünnflüssiger gewordene Mischung auf ein Faltenfilter und läßt am besten über Nacht filtrieren. Es filtriert ungefähr ein Drittel durch; auf den Rest verzichtet man.

Die proteolytische Wirksamkeit des Macerationssaftes steigt in den ersten Tagen nach der Darstellung regelmäßig an und erreicht ihr Maximum beim Stehen im Eisschrank gewöhnlich am zweiten Tag. Später erfolgt wieder langsame Abnahme der Wirksamkeit.

#### b) Papain und verwandte Proteasen.

Das Papain findet sich in den Früchten und im Milchsaft des Melonenbaumes, *Carica Papaya*. Von allen Pflanzenmaterialien zeigt der Milchsaft des Melonenbaumes die kräftigste proteolytische Wirkung. Das Handelspräparat „Papain“ stellt den an der Sonne getrockneten Milchsaft dar, der durch Anschneiden der Früchte gewonnen wird. Das Enzym, meist nur zu einem geringen Teil in aktiver Form vorliegend, wird durch Glutathion, Cystein, Schwefelwasserstoff und Blausäure aktiviert; es zeigt darin seine enge Verwandtschaft mit der katheptischen Proteinase der tierischen Zelle. Auch die  $p_H$ -Optima auf die verschiedenen Substrate sind ähnlich der Proteinase der Organe<sup>4</sup>.

Die bis jetzt erzielte Reinigung des Papains ist nicht erheblich; sie bereitet große Schwierigkeit. Eine Vorreinigung läßt sich durch Umfällen aus 80%igem Alkohol erzielen, am besten nach WILLSTÄTTER<sup>5</sup> so, daß durch vorangehendes Digerieren mit etwas Blausäure die beigemischten pflanzlichen Eiweißkörper möglichst abgebaut werden. Man erzielt dabei eine 2—3fache Reinigung.

<sup>1</sup> E. BUCHNER: „Die Zymasegärung“. München 1903.

<sup>2</sup> A. v. LEBEDEV: Compt. rend. Paris 1911, 152, 49 und 1129.

<sup>3</sup> E. ABDERHALDEN u. FODOR: Ferment-Forsch. 5, 138.

<sup>4</sup> R. WILLSTÄTTER, W. GRASSMANN u. O. AMBROS: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 151, 307.

<sup>5</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. GRASSMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 184.

Reinigung durch Alkoholfällung. Die Papainlösung (6 g in 400 ccm) wird unter Zusatz von Blausäure (1,5 g wasserfrei) 3 Tage auf 40° erwärmt, um die im Rohprodukte enthaltenen Proteine tunlichst abzubauen. Zur Fällung des Papains wird die Lösung auf eine Alkoholkonzentration von 80% gebracht. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser gelöst und durch Einengen im Vakuum bei Zimmertemperatur von den Resten der Blausäure befreit. Enzymausbeute 95%.

Die Reinigung mit Hilfe der Adsorptionsmethoden unter Verwendung der üblichen Adsorbentien ist bisher nicht in befriedigender Weise gelungen<sup>1</sup>. Als beste Art der Reinigung hat sich die Adsorption der Begleitstoffe an einen in der Lösung selbst erzeugten Niederschlag von Bleiphosphat ergeben. Zur Reinigung des Papains führt man die Fällung am besten in möglichst konzentrierter Lösung aus und bemißt den Zusatz an Phosphat so, daß je Papaineinheit etwa 0,2—0,4 mg des Niederschlags entstehen. Man gelangt bei richtiger Durchführung vom rohen Succus Caricae ausgehend, in einer Operation zu Restlösungen mit einem 5—8fachen Enzymwert.

Die auf 0° abgekühlte konz. Enzymlösung (10 g in 25 ccm, vom Ungelösten abgesaugt), deren Enzymgehalt man bestimmt hat, wird mit der erforderlichen Menge konzentrierter Diammonphosphatlösung versetzt. Dazu läßt man unter stetem Umschütteln tropfenweise die berechnete Menge konzentriertes Bleiacetat fließen. Der entstandene Niederschlag wird möglichst rasch abzentrifugiert und die Restlösung mit Ammoniak neutralisiert.

Das Papain liegt anscheinend in einem proteolytisch einheitlichen Zustande vor. Peptidasen haben WILLSTÄTTER und Mitarbeiter<sup>2</sup> in käuflichen Trockenpräparaten nicht gefunden.

Dem Papain nahe stehen zahlreiche Proteasen aus Früchten, z. B. aus Kürbis oder Ananas. Näher untersucht ist das Enzym aus Ananas— das Bromelin. Es zeigt die nämlichen  $p_H$ -Optima wie das Papain<sup>3</sup> und ist wie dieses durch Blausäure oder Schwefelwasserstoff aktivierbar. Die für Papain ausgearbeitete Bestimmungsmethode mit Gelatine als Substrat (S. 755) und Blausäureaktivierung läßt sich ohne Fehler auf die Messung der Ananasprotease übertragen.

Zur Gewinnung des enzymhaltigen Saftes werden die reifen Früchte äußerlich gereinigt, grob zerschnitten und in der Handpresse scharf abgepreßt. Der Preßrückstand gibt weder an Wasser noch an Ammoniak oder Essigsäure nennenswerte Mengen von Enzym ab. Die enzymatische Wirksamkeit des Saftes bewegt sich nach WILLSTÄTTER<sup>4</sup> für 2 ccm Saft bei Einwirkung auf 0,4 g Gelatine bei  $p_H = 5,0$  in 1 Stunde entsprechend einem Aciditätszuwachs von 0,5—1,0 ccm 0,2 n-Kalilauge. Durch Alkoholfällung sowie durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat können wirksame Trockenpräparate hergestellt werden. Im frischen Ananassaft findet man auch ein dipeptidspaltendes Enzym, das aber beim Stehen rasch seine Wirksamkeit verliert. Die Trockenpräparate sind frei von ereptischer Wirkung.

### c) Proteolytische Enzyme der Samen.

Von den Proteasen der höheren Pflanzen sind vor allem noch die Enzyme der ruhenden und gekeimten Samen zu nennen, die die Mobilisierung der pflanzlichen Reservẽproteine bewirken. Während sonst in höheren Pflanzen Proteasen zwar allgemein, aber meist nur in geringer Konzentration, vorkommen dürften, ist die enzymatische Konzentration in den Samen oft eine recht erhebliche. Die in den Samen vorkommenden Proteasen stellen Gemische dar, von einer Proteinase, deren  $p_H$ -Optimum bei  $p_H = 4,0$  liegt und die durch Sulfhydrylverbindungen (Schwefelwasserstoff, Cystein, Glutathion) aktivierbar ist<sup>5</sup>, sowie aus einer Amino-Polypeptidase und einer Dipeptidase. Am besten untersucht sind

<sup>1</sup> H. KRAUT u. E. BAUER: Zeitschr. physiol. Chem. 1926/27, 164, 10.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER und Mitarbeiter: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 84; 1926, 152, 160.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER, W. GRASSMANN u. O. AMBROS: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 166, 262.

<sup>4</sup> R. WILLSTÄTTER, W. GRASSMANN u. O. AMBROS: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 151, 286.

<sup>5</sup> Vgl. E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 203, 117.

die Enzyme des Malzes. Hier hat H. LUNDIN<sup>1</sup> die zwei Komponenten, Proteinase und ereptischen Enzymkomplex, nachgewiesen und K. LINDERSTRÖM-LANG<sup>2</sup> ist es gelungen, sie durch Adsorption an Eisenhydroxyd zu trennen. Das proteolytische System der Samen scheint dem anderer pflanzlicher Zellen z. B. der Hefen zu entsprechen. Nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. PURR<sup>3</sup> findet man die Proteinase im ruhenden Samen (Gerste) nahezu inaktiv, aber aktivierbar durch Schwefelwasserstoff und Blausäure. Im Verlauf der Keimung wird das Enzym durch Bildung von Glutathion in seiner reduzierten Form in aktiviertes Enzym übergeführt.

Gewinnung von Enzymlösungen aus Malz. Die Freilegung der proteolytischen Enzyme erfolgt durch Extraktion mit Wasser oder Glycerin. Nach LUNDIN werden 100 g feingemahlene Malz 2 Stunden lang unter oft wiederholtem Umschwenken mit 400 ccm Wasser bei Zimmertemperatur extrahiert und der erhaltene Extrakt klar filtriert. Ähnlich verfährt LINDERSTRÖM-LANG<sup>2</sup>; er reinigt die Enzymlösung weiter durch Dialyse unter verminderten Drucke. Die Abtrennung der Proteinase wird durch einmalige Adsorption an Eisenhydroxyd bei  $p_H = 8,4$  bewirkt. Die Restlösung ist hernach proteinasefrei.

Zur Darstellung eines Glycerinauszuges werden nach LINDERSTRÖM-LANG 200 ccm feingemahlene Grünmalz mit 200 ccm Glycerin innig vermischt und nach etwa eintägigem Stehen im Eisraum filtriert.

#### d) Nucleasen.

Unter den Namen Nucleasen werden alle diejenigen Enzyme zusammengefaßt, die die Spaltung der Nucleinsäuren in ihre Komponenten herbeiführen. Der enzymatische Abbau der Nucleinsäuren im lebenden Organismus verläuft stufenweise. LEVENE<sup>4</sup> nimmt entsprechend der Struktur der Nucleinsäuren drei Stufen des Abbaues an. Die Polynucleotidasen haben die Aufgabe, die Zwischenbindungen zwischen den einzelnen Nucleotiden, aus denen sich die Nucleinsäure zusammensetzt, zu lösen. Die Nucleotidasen greifen die Esterbindungen der Kohlenhydrat-Phosphorsäure an unter Zurücklassung eines Nucleosids. Die Nucleoside schließlich fallen dem Abbau durch Nucleosidasen anheim unter Bildung des freien Kohlenhydrats und der Base (Purine bzw. Pyrimidine).

Über die erste Stufe des Abbaus ist nicht viel bekannt; die Wirkung der Polynucleotidase ist wohl auch nie isoliert von den anderen Nucleasen gefunden worden. Im allgemeinen werden durch Organextrakte z. B. aus Leber oder Niere Nucleinsäuren unter Abspaltung von Phosphorsäure in Nucleoside und diese weiterhin durch die Nucleosidase in das freie Kohlenhydrat und die Base übergeführt. Eine Trennung dieses Enzymkomplexes ist bis jetzt noch nicht gelungen. Immerhin ist es nach W. DEUTSCH<sup>5</sup> sowie nach S. J. THANNHAUSER<sup>6</sup> möglich, auf Grund der verschiedenen Geschwindigkeit, mit welcher die beiden Enzyme wirken, die Spaltprodukte des zuerst zur Wirkung kommenden Enzyms wenigstens zum Teil zu isolieren. Aber in der Natur kommen die beiden Enzyme — die Nucleotidase und die Nucleosidase auch getrennt vor. P. A. LEVENE<sup>7</sup> konnte aus einer Darmfistel vom Hunde Dünndarmsaft gewinnen, der Nucleinsäuren nur bis zur Stufe der Nucleotide spaltet. Und im Knochenmark des Rindes ist nach W. DEUTSCH<sup>8</sup> die Nucleosidase vollkommen frei von Nucleotidase in ziemlich wirksamer Form zu gewinnen.

<sup>1</sup> H. LUNDIN: Biochem. Zeitschr. 1922, **131**, 193.

<sup>2</sup> K. LINDERSTRÖM-LANG u. M. SATO: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, **184**, 83.

<sup>3</sup> Vgl. E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **203**, 117.

<sup>4</sup> P. A. LEVENE u. MEDIGRECEANU: Journ. of biol. Chem. 1911, **9**, 65, 389.

<sup>5</sup> W. DEUTSCH: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, **171**, 264. — W. DEUTSCH u. R. LASER: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **186**, 1.

<sup>6</sup> S. J. THANNHAUSER u. M. ANGERMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **186**, 13.

<sup>7</sup> P. L. LEVENE: Journ. of biol. Chem. 1929, **81**, 711. — LEVENE u. LONDON: Journ. of biol. Chem. 1929, **83**, 793. — LEVENE u. MORI: Journ. of biol. Chem. 1929, **83**, 803.

<sup>8</sup> W. DEUTSCH u. R. LASER: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **186**, 1.

Im übrigen kommen die Nucleasen in fast allen tierischen Organen gemeinsam vor (vgl. dazu W. DEUTSCH und RÖSLER<sup>1</sup>). Auch in Pflanzen, insbesondere in Samen, ferner in der Hefe sind sie zu finden. Die Frage ob pflanzliche und tierische Nucleinsäuren, die sich in ihrer Zusammensetzung ja unterscheiden, verschiedener Enzyme zu ihrem Abbau bedürfen, steht noch offen.

### 1. Nucleotidase.

Die Nucleotidase z. B. aus Leber spaltet aus Nucleinsäuren Phosphorsäure ab; man kann die Fermentleistung an der Zunahme des anorganischen Phosphats messen. Als Substrat kommt thymusnucleinsaures Natrium zur Verwendung, das nach der Vorschrift von FEULGEN<sup>2</sup> bereitet wird. Die Bestimmung der Nucleotidase wird nach W. DEUTSCH<sup>3</sup> bei dem  $p_H$ -Optimum 8,7 vorgenommen. Für die Bestimmung der Phosphorsäure wählt man sich eine für die Messung kleiner Phosphorsäuren geeignete Methode z. B. die Methode nach LIEB, in der Modifikation nach KUHN<sup>4</sup>.

Ausführung der Bestimmung. Zu 20 ccm einer 4%igen Lösung von thymusnucleinsaurem Natrium, die ebenso wie die benutzte Enzymlösung mit Natronlauge auf  $p_H = 8,7$  eingestellt ist, werden 10,0 ccm n-Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer (1:1) und die zu bestimmende Fermentlösung gegeben (z. B. 2—8 ccm Glycerinauszug aus Leber) und mit Wasser bzw. mit Glycerin zu einem Gesamtvolumen von 40,0 ccm und zu einem Glyceringehalt von 17% ergänzt. Der Ansatz verbleibt für eine Stunde im Thermostaten bei 40°. Nach Ablauf der Bestimmungszeit werden nach gutem Durchschütteln 10,0 ccm entnommen und zu 10,0 ccm 10%iger Trichloressigsäure zur Enteiweißung gegeben, wobei die Fermentwirkung gleichzeitig unterbrochen wird. Nach 5 Minuten langem Stehen wird der Niederschlag abfiltriert, vom Filtrat 10,0 ccm entnommen und die freie anorganische Phosphorsäure nach Alkalisierung mit 2%igem Ammoniak durch Magnesiamischung gefällt. Der nach wenigstens 5stündigem Stehen abfiltrierte Niederschlag wird in Salpetersäure gelöst und als Ammoniumphosphormolybdat nach LIEB in der Modifikation nach KUHN<sup>4</sup> gefällt und titrimetrisch bestimmt. Zu jeder Bestimmung wird eine Analyse des Substratleerwertes und der Fermenteigenspaltung ausgeführt. Zur Berechnung der Fermentleistung wird die Summe des Substratleerwertes und der Fermenteigenspaltung von dem Wert des Hauptansatzes in Abzug gebracht.

Auf Grund der Beziehung zwischen Fermentmenge und Umsatz, die nahezu linear gefunden wird, stellt W. DEUTSCH ein Maß für die Nucleotidase der Leber auf, die Hepato-Nucleotidase-Einheit, als welche diejenige Enzymmenge definiert ist, die unter den angegebenen Bedingungen bei der Einwirkung auf 0,8 g thymusnucleinsaures Natrium in 1 Stunde einen Zuwachs an freiem anorganischen Phosphor entsprechend 6,25 ccm 0,1 n-Natronlauge bewirkt. (1 ccm n-Natronlauge entspricht 0,1104 mg Phosphor.) Eine solche Enzymeinheit ist in etwa 10,0 ccm des Rohglycerinauszugs aus Rinderleber enthalten.

Kommt es bei präparativen Versuchen darauf an, eine vollständige Abspaltung der gebundenen Phosphorsäure aus dem Nucleotidkomplex der Thymusnucleinsäure zu erreichen, so gibt man nach W. DEUTSCH Magnesiumacetat zum Reaktionsgemisch, um die entstehende, hemmend wirkende freie Phosphorsäure als Bodenkörper abzufangen. Es gelingt so die Geschwindigkeit der Reaktion zu erhöhen und nach mehrmaliger Zugabe neuen Enzyms die Abspaltung der Phosphorsäure bis zu 99% zu treiben.

Gewinnung von wirksamen Leberauszügen. Die Leber enthält nach W. DEUTSCH von allen tierischen Organen die Nucleotidase am reichlichsten. Am besten eignet sich zur Darstellung von Enzympräparaten die Extraktion des frischen Organs mit schwach alkalischem Glycerin.

<sup>1</sup> W. DEUTSCH u. RÖSLER: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, 185, 146.

<sup>2</sup> R. FEULGEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1914, 90, 261.

<sup>3</sup> W. DEUTSCH: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 171, 264; 1930, 186, 11.

<sup>4</sup> R. KUHN: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 129, 64; Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 3, 304.

Frisch vom Schlachthof bezogene Rinderleber wird fein zermahlen, der Organbrei mit 0,15% Ammoniak enthaltendem 87%igen Glycerin 15 Minuten lang geschüttelt (für 1 g Leber 2 ccm Glycerin), 4—5 Stunden im Thermostaten bei 40° digeriert und dann durch Faltenfilter filtriert.

Durch Ansäuern der Glycerinauszüge mit Essigsäure gelingt es, bei  $p_H = 4,7$  eine Eiweißfraktion auszufällen, die den gesamten Fermentgehalt des Glycerinauszuges enthält. Durch Lösung der Fällung mit verdünnter Natronlauge kann man das Enzym in konzentrierterer und in etwa dreifach reinerer Form erhalten, als es in den Rohauszügen vorliegt.

## 2. Nucleosidase.

Die Darstellung eines wirksamen Nucleosidasepräparates aus Niere und die quantitative Messung dieses Enzyms beschrieben H. EULER und E. BRUNIUS<sup>1</sup>. Als Substrat zur Enzymbestimmung verwenden diese Forscher Adenosin, das nach LEVENE<sup>2</sup> aus Hefenucleinsäure dargestellt wird. Die Methodik zur Messung der Adenosinspaltung gründet sich auf die Bestimmung der durch die Spaltung zunehmenden Konzentration der freien Ribose, welche nach der Mikromethode von SHAFFER-HARTMANN<sup>3</sup> ermittelt wird.

Der Reaktionsansatz hat folgende Zusammensetzung: 50 mg Adenosin, 5 ccm  $\frac{1}{15}$  Mol. Phosphatmischung,  $p_H = 7,5$ , werden mit Enzymlösung und Wasser zusammen auf 25 ccm aufgefüllt. Aus den von Zeit zu Zeit der Reaktionsmischung (Temperatur 30°) entnommenen Proben werden Eiweißstoffe durch Quecksilberacetat ausgefällt, wodurch zugleich die Enzymreaktion unterbrochen wird. Bevor die Ribose bestimmt wird, fällt man das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff aus, vertreibt diesen mit Luft und neutralisiert die freie Essigsäure. Die erhaltenen Kupferwerte werden nach SHAFFER-HARTMANN als Glucose berechnet.

Die Nucleosidspaltung verläuft im ersten Teil der Reaktion monomolekular, die Spaltungsgeschwindigkeit läßt sich also durch eine Konstante 1. Ordnung gut ausdrücken. Das Maß für die enzymatische Konzentration definiert EULER:  $Ns \cdot f = k/g$  Enzympräparat, wo  $Ns \cdot F$  die Aktivität der Nucleosidase,  $k$  die Konstante der Reaktionsgleichung und  $g$  Enzympräparat die Menge Enzym (Trockengewicht) der Enzymlösung bedeutet, welche in 1 ccm der Reaktionsmischung vorhanden ist.

Gewinnung des Ausgangsmaterials. 2 kg feingemahlene Schweinenieren werden mit 3,5 Liter Wasser versetzt und nach Zusatz von Toluol 24 Stunden bei 40° autolytisiert; hierauf wird durch ein Sieb getrieben. Nach weiterem eintägigem Stehen sind große Eiweißmengen ausgeflockt, so daß durch Zentrifugieren eine ziemlich klare Enzymlösung erhalten wird.

Beispielsweise liefern 5 ccm dieser Enzymlösung, dem Reaktionsansatz zugesetzt, in 2 Stunden eine Ribosemenge entsprechend 0,423 mg Kupfer, d. i. 0,242 mg Ribose, in 4 Stunden 0,930 mg Kupfer, d. i. 0,484 mg Ribose.  $K$  berechnet sich in diesem Versuch zu  $3,8 \cdot 10^4$ . Da das Trockengewicht von 2 ccm Enzymlösung 0,0645 g ist, berechnet sich somit  $Ns \cdot F = 3,8 \cdot 10^4 / 0,0645 = 0,059$ .

Reinigung des Enzyms. Es gelingt, das Enzym auf das etwa 10fache der Rohlösung durch fraktionierte Acetonfällung und darauffolgende Ausfällung mit Essigsäure beim isoelektrischen Punkte zu reinigen.

Fraktionierte Acetonfällung. 60 ccm Nierensaft von  $Ns \cdot f = 0,06$  werden mit 40 ccm Aceton versetzt. Der auftretende Niederschlag wird abzentrifugiert; er enthält nur wenig Enzym. Der Restlösung werden nun weitere 20 ccm Aceton zugesetzt, so daß die Konzentration des Acetons jetzt 50% beträgt. Die erhaltene Fällung wird abzentrifugiert und in Wasser gelöst.

$$k \cdot 10^4 = 2,9 \text{ Trockengewicht in 2 ccm} = 0,0086 \text{ g.}$$

$$Ns \cdot f = 0,34 \text{ Steigerung der Aktivität } 5,5.$$

<sup>1</sup> H. v. EULER u. BRUNIUS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1927, 60, 1584.

<sup>2</sup> P. A. LEVENE: In Methodik der Fermente, herausgegeben von C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN: 1929, S. 377.

<sup>3</sup> SHAFFER-HARTMANN: Journ. biol. Chem. 1921, 45, 378.

Ausfällung am isoelektrischen Punkt. Zu 50 ccm acetonfraktionierten Nierensaftes wird 1 ccm n-Essigsäure zugesetzt. Die auftretende Fällung, die kein Enzym enthält, wird abzentrifugiert. Die Restlösung wird mit Natronlauge neutralisiert, wobei eine weitere ebenfalls inaktive Fällung auftritt. Die Restlösung der beiden Fällungen wird nun mit dem doppelten Volumen Aceton gefällt; die erhaltene Fällung wird in 50 ccm Wasser gelöst.

$$k \cdot 10^4 = 5,2 \quad \text{Trockengewicht in 2 ccm} = 0,009898.$$

$$Ns \cdot f = 0,56 \quad \text{Steigerung der Aktivität } 9,4.$$

W. DEUTSCH gewinnt aus Knochenmark von Rindern ähnlich wirksame Auszüge wie EULER aus Schweinenieren. Die Enzymlösung aus Knochenmark ist nach W. DEUTSCH und RÖSLER<sup>1</sup> frei von Nucleotidase.

## E. Amidasen.

### 1. Histozym.

Das Histozym vermag aus benzoilylierten Aminosäuren und Peptiden Benzoesäure abzuspalten; beobachtet wurde ferner noch die Zerlegung von Acetylglycin und Phenacetursäure<sup>2</sup> und die Abspaltung von Cholalsäure aus Glykochol- und Taurocholsäure<sup>3</sup>. Das Histozym kommt besonders reichlich in der Niere, aber auch in Leber, Blut, Geweben von Säugetieren, in Pilzen und Bakterien vor.

α) Messung des Histozyms nach WILLSTÄTTER<sup>4</sup>. Für die Wirksamkeit des Histozyms ist die Spaltung von Hippursäure in Glykokoll und Benzoesäure charakteristisch. Die Reaktion kann durch alkoholische Titration nach R. WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ oder durch die Methode nach VAN SLYKE verfolgt werden. Da aber durch diese Methoden auch proteolytische Vorgänge mit erfaßt werden, verdient ein anderes für die Histozymwirkung spezifisches Verfahren den Vorzug, nämlich die Extraktion der abgetrennten Benzoesäure mit geeigneten organischen Lösungsmitteln, z. B. Petroläther und Titration der Benzoesäure im Extrakt durch alkoholische Lauge. Die Extraktion findet am besten in Rapidextraktoren mit Rührwerk statt, in welchen die Extraktion bei genügender Destillations- und Rührgeschwindigkeit in 3–4 Stunden beendet ist.

Der Bestimmung des Histozyms wird seine Einwirkung auf Hippursäure bei optimalem  $p_H$  von 7,4 zugrunde gelegt.

Ausführung. In 10 ccm m-Natriumhippurat-Lösung und 2 ccm 0,2 m Phosphatgemisch von  $p_H = 7,1$  gibt man die meist glycerinhaltige Enzymlösung und die in einem Vorversuch ermittelte Menge Säure oder Lauge, die nötig ist, um Enzymlösung und gegebenenfalls auch Hippuratlösung auf das gewünschte  $p_H$  zu bringen, dann soviel Glycerin, daß nach Auffüllen mit Wasser auf 50 ccm im ganzen ein Gehalt von 16% erreicht wird. (Glycerin- und Phosphatgehalt muß immer konstant gehalten werden, weil beide Zusätze die Enzymwirkung stark hemmen.) Nach Zugabe von 2 ccm Toluol wird bei 30° aufbewahrt, am Ende der Reaktionszeit, gewöhnlich 24, 48 oder 96 Stunden, mit 10 ccm 2 n-Schwefelsäure gestoppt, mit Petroläther extrahiert und nach Zusatz von einer der Petrolätherlösung gleichen Menge 96%igen Alkohols und von 2 ccm einer alkoholischen 0,5%igen Thymolphthaleinlösung mit alkoholischer 0,2 n-Kalilauge titriert.

Als Histozym-Einheit wird diejenige Enzymmenge gewählt, die unter obigen Bedingungen in 24 Stunden eine Spaltung von 2 ccm 0,2 n-Benzoesäure gibt. In der folgenden Tabelle sind für die jeweiligen Spaltungswerte die zugehörigen Enzymwerte zusammengestellt.

<sup>1</sup> W. DEUTSCH u. RÖSLER: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, 185, 146.

<sup>2</sup> A. SMORODINZEW: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 124, 123.

<sup>3</sup> W. GRASSMANN u. KALI PADA BASU: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 198, 247.

<sup>4</sup> R. WILLSTÄTTER u. E. WALDSCHMIDT-LEITZ: Nach noch unveröffentlichten Versuchen.

Tabelle 9. Spaltungswerte und Enzymeinheiten.

| Spaltung<br>ccm 0,2 n<br>in 24 Stunden | Histozym-<br>Einheit | Spaltung<br>ccm 0,2 n<br>in 24 Stunden | Histozym-<br>Einheit | Spaltung<br>ccm 0,2 n<br>in 24 Stunden | Histozym-<br>Einheit |
|--|----------------------|--|----------------------|--|----------------------|
| 0,21                                   | 0,1                  | 1,43                                   | 0,7                  | 2,48                                   | 1,3                  |
| 0,42                                   | 0,2                  | 1,62                                   | 0,8                  | 2,62                                   | 1,4                  |
| 0,63                                   | 0,3                  | 1,81                                   | 0,9                  | 2,75                                   | 1,5                  |
| 0,84                                   | 0,4                  | 2,00                                   | 1,0                  | 2,87                                   | 1,6                  |
| 1,04                                   | 0,5                  | 2,17                                   | 1,0                  | 2,97                                   | 1,7                  |
| 1,24                                   | 0,6                  | 2,34                                   | 1,2                  | —                                      | —                    |

β) Gewinnung von Enzympräparaten. Das Vorkommen des Histozyms ist nach R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ am beträchtlichsten in der Niere, wobei das Enzym aus der Pferdeniere gar nicht, aus Schweineniere nur teilweise, aus Hundeniere aber vollständig löslich ist in wäßrigen Mitteln und in Glycerin. Die Extraktion der frischen Nieren mit Glycerin liefert stark rot gefärbte Lösungen mit gutem Histozymsgehalt; die Extrakte sind monatelang mit unverminderter Wirksamkeit haltbar.

Ausführung. Frische Nieren (von Hunden) werden gereinigt und durch die Fleischmaschine getrieben; der Organbrei mit 3 Volumen 87%igem Glycerin verrührt, und nach mehrstündigem Stehen vom Ungelösten abzentrifugiert. 3 ccm eines solchen Extraktes ergeben in 24 Stunden unter den Bedingungen der Bestimmungsmethode z. B. einen Spaltungswert von 1,70 ccm 0,2 n-Benzoesäure entsprechend 0,85 Enzymeinheiten.

γ) Trennung des Nierenhistozyms von ereptischen Enzymen und Esterase. Für die präparative Anwendung des Histozyms, sowie für Spezifitätsuntersuchungen ist es notwendig, das Histozym von den begleitenden proteolytischen Enzymen, sowie von Esterase abzutrennen. Die Isolierung des Enzyms von den ereptischen Begleitenzymen ist besonders schwierig, da es in äußerst benachteiligter Konzentration im Ausgangsmaterial vorhanden ist. Nach R. WILLSTÄTTER und Mitarbeitern ist der Glycerinauszug aus Hundeniern praktisch frei von Proteinase, während die ereptischen Enzyme durch Adsorptions- und Elutionsvornahmen, denen eine Hitzebehandlung vorausgeht, vom Histozym abgetrennt werden können.

Ausführung. Die Enzymlösung mit einem Glyceringehalt von etwa 75—80% wird 4 Stunden auf 70° erhitzt; dabei werden etwa 94% der ereptischen Enzyme und etwa 50% des Histozyms zerstört. 50 ccm des erhitzten Extraktes werden noch heiß in ein Gemisch von 50 ccm n-Natriumhippuratlösung vom  $p_H = 7,1$  und 200 ccm Wasser gegeben, gut durchgeschüttelt und der dabei entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Die Histozymsausbeute in der Lösung, bezogen auf den Extrakt nach der Erhitzung, betrug in einem Beispiel 54%, die der ereptischen Enzyme 1,2%.

Die so gewonnene Lösung wird bei  $p_H = 4,4$  mit Eisenhydroxyd adsorbiert (10 ccm Eisenhydroxyd enthalten 180 mg  $Fe_2O_3$  auf 100 ccm Lösung). Das Adsorbat wird nach zweimaligem Auswaschen mit 30%igem Glycerin mit soviel 30%igem Glycerin, als der angewandten Hippuratlösung entspricht, durchgeschüttelt, mit Ammoniak versetzt (0,1 ccm n-Ammoniak je 10 ccm) und zentrifugiert. Die Elution enthält das gesamte Erepsin. Das Adsorbat wird mit 30%igen Glycerin gewaschen und dann aufgeschlämmt mit soviel 30%igen Glycerin, als die Elutionsflüssigkeit betrug. 12 ccm der Suspension enthielten in einem Beispiel 0,14 Histozym-Einheiten und kein Erepsin, ebenso keine Esterase.

## 2. Urease.

Die Urease zerlegt Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure; es ist die einzige bekannte Reaktion, die dieses Enzym zu vermitteln vermag. Die Urease kommt in Pflanzensamen, besonders reich in den Samen der Leguminosen vor, wo sie für den Eiweißstoffwechsel eine bedeutende Rolle spielt; der intermediär gebildete Harnstoff, der nicht ausgeschieden wird, wird durch das Enzym zerlegt und der Stickstoff in Form von Ammoniak für synthetische Zwecke

wieder bereitgestellt. Im übrigen findet sich die Urease noch in Bakterien, an denen man ihre Wirkung zuerst bemerkt hat. Im tierischen Organismus findet sich das Enzym nur ganz vereinzelt und in geringen Mengen.

Die für die Ureasewirkung optimale Wasserstoffzahl ist nach D. D. VAN SLYKE und G. ZACHARIAS<sup>1</sup>  $p_H = 7,0$ ; nach ST. LÖVGREN<sup>2</sup> ist das  $p_H$ -Optimum etwas abhängig von der Substratkonzentration, so zwar, daß die optimale Wasserstoffzahl bei fallender Substratkonzentration zunimmt. Bei der Harnstoffspaltung ändert sich naturgemäß die Reaktion beträchtlich. Man muß daher, wenn man die durch die Alkalisierung bewirkte Verlangsamung des Prozesses vermindern will, sehr stark puffern.

α) Die Messung der Enzymwirkung. Zur Messung der Enzymwirkung bestimmt man entweder den noch vorhandenen Harnstoff mittels Xanthohydrol nach FOSSE<sup>3</sup> oder zweckmäßiger durch Titration des gebildeten Ammoniaks, nachdem man ihn aus der Lösung mittels eines Luftstromes ausgetrieben hat. Die Harnstoffzerlegung durch Urease verläuft nach EULER und BRUNIUS in den ersten Stadien annähernd monomolekular, wenn bestimmte Bedingungen (steigendes und optimales  $p_H$ ) eingehalten werden.

Zur Bestimmung der Wirksamkeit eines Ureasepräparates, z. B. der Arlcourease, wird nach EULER<sup>4</sup> auf folgende Weise verfahren: In 25 ccm Wasser werden 0,5 g des Präparates gelöst; Trockengewicht in 5 ccm 0,0931 g. Reaktionsgemisch: 20 ccm 1 mol. Harnstofflösung + 50 ccm 0,5 mol. Phosphatmischung  $p_H = 7,30$  + 10 ccm Enzymlösung + 20 ccm Wasser. Gesamtvolumen somit 100 ccm; die Harnstoffkonzentration beträgt in der Mischung 0,2 Mol. Für die Messung des abgespaltenen Ammoniaks werden je 10 ccm entnommen und in 10 ccm 0,5 n-Schwefelsäure einpipetiert, wodurch die Enzymreaktion gehemmt wird. Das Ammoniak wird nach der FOLINSCHEN Ausblasmethode in der Modifikation nach ST. LÖVGREN<sup>5</sup> bestimmt. Die Probe wird mit 20 ccm Wasser und einigen Tropfen Phenolphthalein, dann mit 20 ccm einer 50%igen Kaliumcarbonatlösung und etwas Oktylalkohol zur Verhütung des Schäumens versetzt. Hierauf wird durch einen kräftigen Luftstrom das Ammoniak 1 Stunde lang bei 60° in 40 ccm vorgelegter 0,1 n-Schwefelsäure übergetrieben. Der Luftstrom wird, bevor er in die Lösung geleitet wird, mit konzentrierter Schwefelsäure gewaschen, um ihn von Ammoniakspuren zu befreien. Die unverbrauchte Schwefelsäure wird nach dem Versuch mit 0,1 n-Natronlauge zurücktitriert.

1 ccm 0,1 n-Schwefelsäure entspricht 1,7 mg Ammoniak bzw. 2,998 mg Harnstoff. Die Nullprobe wird nach EULER so ausgeführt, daß zu den Zeiten 1, 5, 10 usw. Minuten Proben genommen werden; die dabei gefundenen Werte werden in eine Kurve eingetragen und der Wert für die Zeit 0 extrapoliert. Der so berechnete Wert wird von den folgenden abgezogen.

In dem oben angeführten Versuch wird z. B. nach 15 Minuten 4,37 ccm 0,1 ccm n-Schwefelsäure von dem abgespaltenen Ammoniak gebunden entsprechend einer 10,9%igen Harnstoffspaltung. K berechnet sich danach zu  $3,4 \cdot 10^{-4}$ . Der Ureasewert des angewandten Präparates nach EULER ist  $U \cdot f = \frac{k \cdot g \text{ Substrat}}{g \text{ Enzympräparat}} = 0,026$ .

In der Literatur hat sich vielfach eine andere von J. B. SUMNER<sup>6</sup> eingeführte Enzymeinheit bewährt. Eine Ureaseeinheit nach SUMNER entspricht derjenigen Enzymmenge, die 1 mg Ammoniak in 5 Minuten bei 20° unter bestimmten Bedingungen aus Harnstoff abspaltet. Für die Bestimmung nach SUMNER wird folgende Harnstoff-Phosphatlösung von  $p_H = 7,0$  bereitet, die 3% Harnstoff, 6,8%  $Na_2HPO_4$  und 2,8%  $KH_2PO_4$  enthält.

Der Bestimmungsansatz nach SUMNER setzt sich aus 20 ccm der Harnstoffphosphatlösung und einer entsprechenden Menge Enzymlösung (z. B. ein Extrakt aus 0,1–0,3 g Jackbohnenmehl) + Wasser zu einem Volumen von 20 ccm zusammen. Die Reaktion wird

<sup>1</sup> D. D. v. SLYKE u. G. ZACHARIAS: Journ. biol. Chem. 1914, 19, 181.

<sup>2</sup> ST. LÖVGREN: Biochem. Zeitschr. 1923, 137, 206.

<sup>3</sup> FOSSE: Compt. rend. Paris 1914, 158, 1076, 1432, 1588.

<sup>4</sup> H. v. EULER u. E. BRUNIUS: Biochem. Zeitschr. 1927, 133, 1.

<sup>5</sup> ST. LÖVGREN: Biochem. Zeitschr. 1921, 119, 231.

<sup>6</sup> J. B. SUMNER: Journ. Biol. Chem. 1926, 69, 435. — J. B. SUMNER u. D. B. HAND: Journ. Biol. Chem. 1927/28, 76, 149.



bei 20° durchgeführt und bei einer Reaktionszeit von 5 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit wird mit 10 ccm 0,5 n-Schwefelsäure die Enzymwirkung abgestoppt. Die Ammoniakbestimmung kann nach FOLIN ausgeführt werden, wie oben angegeben.

Der Ureasewert wird ausgedrückt in Urease-Einheiten je Gramm Trockenpräparat. So enthält nach SUMNER 1 g von Sojabohnenmehl 15, von Jackbohnenmehl 75, von Arlcopräparat 95—175, und von kristallisierter Urease nach SUMNER 120000—130000 Einheiten.

Für die vergleichende Bestimmung der Urease sind noch folgende Gesichtspunkte zu beachten: Vor allem ist die Ausschaltung des Einflusses akzessorischer Stoffe auf die Aktivität anzustreben. Der lange bekannte, aktivitätssteigernde Einfluß gewisser Stoffe, z. B. von Aminosäuren und Blausäure wird nur bei unreinen<sup>1</sup> nicht mehr bei den reinsten Ureasepräparaten<sup>2</sup> beobachtet; er ist also auf die Überwindung hemmender Begleitstoffe, wahrscheinlich von Schwermetallen zurückzuführen. Als Mittel zur „ausgleichenden Aktivierung“ des Enzyms, das den Vergleich der Wirksamkeit unabhängig vom Reinheitsgrade gewährleistet, hat sich nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und F. STEIGERWALDT<sup>3</sup> die Anwendung eines durch zusätzliche Mengen Alanin und Cystein in seiner Wirkung verstärkten tryptischen Verdauungsgemisches aus Casein bewährt.

Die Urease ist besonders in reiner Form äußerst empfindlich gegen Schwermetalle. Als einen gewissen Schutz vor dieser Vergiftung gibt SUMNER<sup>2</sup> den Zusatz von Gummi arabicum-Lösung an (2% in der Enzymlösung). Zur Vermeidung von Giftwirkung muß außerdem unter peinlichster Sorgfalt gearbeitet werden. Die Verwendung gewöhnlich destillierten Wassers ist unter allen Umständen zu vermeiden. Die darin gelösten Spuren von Schwermetallen können genügen, reine Urease innerhalb weniger Minuten zu vernichten. Das Wasser wird deshalb aus Glasapparaten doppelt destilliert. Glasgefäße, in denen Urease-lösungen aufbewahrt oder in denen Bestimmungen ausgeführt werden, sind mit rauchender Salpetersäure, dann mit Ammoniak und zuletzt mit reinem Wasser zu spülen.

β) Gewinnung von Ureasepräparaten. Als Ausgangsmaterial für die Darstellung wirksamer Ureasepräparate eignen sich Soja- und Jackbohnen. Nach VAN SLYKES Methode<sup>4</sup> werden die entfetteten und feingemahlene Mehle mit etwa dem 5fachen Volumen Wasser mehrere Stunden bis einen Tag extrahiert, und die wäßrige Enzymlösung in einen zehnfachen Überschuß von Aceton eingegossen. Der Niederschlag enthält das Enzym mit kaum geminderter Wirksamkeit. Er kann getrocknet und als Pulver aufbewahrt werden, das zum größten Teil löslich ist. Ein nach diesem Verfahren hergestelltes, sehr wirksames Präparat bringt die Firma Arlington, Chemical Company, Yonkers New York, unter den Namen „Arlco-Urease“ in den Handel.

Die Darstellung eines hochaktiven Präparates in kristallisierter Form gelingt J. B. SUMNER<sup>5</sup> auf folgende Weise: Benötigte Lösungen:

1. Aus einem Glasapparat umdestilliertes Wasser. Das zu destillierende Wasser wird mit ein paar Tropfen Schwefelsäure angesäuert. Die Korkstopfen werden, um alle Vergiftungsmöglichkeiten zu vermeiden, mit einem geschärften Glasrohr gebohrt.

2. Aus Glas umdestilliertes reinstes Aceton.

3. Phosphatpuffer ( $p_H = 6,1$ ) in 32% Aceton. 160 ccm Aceton wird mit folgender Phosphatmischung auf 500 ccm aufgefüllt. 250 ccm 0,2 mol.  $KH_2PO_4$  reinst + 72 ccm 0,1 n-Natronlauge.

4. 32%iges Aceton. 160 ccm Aceton werden mit reinstem Wasser zu 500 ccm aufgefüllt. 100 g Jackbohnenmehl werden in einem Becherglase bei Zimmertemperatur mit 500 ccm 32%igem Aceton übergossen und 4—5 Minuten mit einem Porzellanspatel stark gerührt.

<sup>1</sup> M. JACOB: Ferment-Forsch. 1928/29, 10, 1.

<sup>2</sup> J. B. SUMNER u. K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 189, 218.

<sup>3</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. F. STEIGERWALDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 195, 260.

<sup>4</sup> D. D. v. SLYKE u. G. E. CULLEN: Journ. Biol. Chem. 1914, 19, 2, 211.

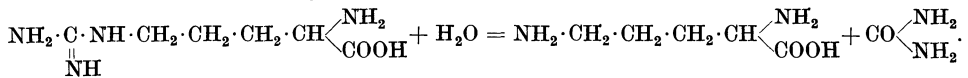
<sup>5</sup> J. B. SUMNER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 582.

Dann wird allmählich, d. h. in 5 Minuten das Gemisch auf ein Faltenfilter (28 cm Durchmesser, Schleicher & Schüll 588) in einem großen Trichter gebracht, der in einem hohen Zylinder hängt. Wenn alles auf den Trichter ist, wird das Ganze in den Eiskasten gebracht und steht da 5—24 Stunden bei  $-2^{\circ}$ , so daß die durchfiltrierte Flüssigkeit, die anfangs vollkommen klar sein soll, mit Eis umgeben ist. Die nunmehr durch Krystalle und amorphe Beimengungen getrübe Flüssigkeit wird scharf zentrifugiert, wobei man gekühlte Zentrifugengläser und gekühlte Halter für die Gläser verwendet. Das abzentrifugierte Material, das im Mikroskop kubisch aussehende Krystalle nebst amorphen Flocken zeigen soll, wird einmal mit 35%igem eiskaltem Aceton in der Zentrifuge gewaschen, dann in 5 cm reinem Wasser aufgelöst. Das meiste der Beimengungen bleibt ungelöst und wird durch Zentrifugieren beseitigt. Die klare Lösung wird mit Aceton zu 32% versetzt und dann mit 2 bis 4 Tropfen des acetonhaltigen Puffers. Haben sich nach 20 Stunden im Eis noch keine Krystalle gezeigt, werden noch 2 Tropfen des Puffers hinzugegeben usw. In dieser Weise gewinnt man durch einmalige Umkrystallisation ein nur aus Krystallen bestehendes Präparat, das einen Reinheitsgrad von 100 000—130 000 SUMNER-Einheiten hat. Aus 100 g Mehl kann man 20—30 mg krystallisierte Urease erhalten. Zum Schlusse werden die Krystalle mit verdünntem Puffer und dann einmal mit 35%igem Aceton gewaschen. Die Lösung der Krystalle in einigen Kubikzentimetern Wasser ist im Eisschrank recht haltbar.

Die Ureasekrystalle sind nach SUMNER der Hauptmenge nach ein Globulin. SUMNER hat es wahrscheinlich gemacht, daß das Enzym an diesen Eiweißkörper nicht nur adsorptiv gebunden ist. Nach E. WALDSCHMIDT-LEITZ und F. STEIGERWALDT<sup>1</sup> ist das Globulin indes auch nicht identisch mit dem Enzym zu betrachten. Es gelingt nämlich, das Globulin mit proteolytischen Enzymen teilweise abzubauen, ohne die Aktivität des Enzyms zu schädigen. Man wird daraus schließen müssen, daß in den „Ureasekrystallen das Globulin ein unspezifischer, wenn auch vielleicht bevorzugter Träger des ureatisch-aktiven Komplexes“ ist.

### 3. Arginase.

Die Arginase ist als ein spezifisch auf Arginin eingestelltes Enzym zuerst von A. KOSSEL und H. D. DAKIN<sup>2</sup> in der Leber aufgefunden und beschrieben worden; seine Wirkung besteht in der Zerlegung des Arginins, der Guanidaminovaleriansäure in die Diaminovaleriansäure oder Ornithin und in Harnstoff nach der Gleichung:



Gebundenes Arginin z. B. in Eiweißkörpern wird von der Arginase nicht angegriffen. Erst im Dipeptid Arginyl-Arginin steht nach S. EDLBACHER und H. BURCHARD<sup>3</sup> der eine der beiden Guanidylreste dem enzymatischen Angriff offen. Es ist zu vermuten, daß die Arginase zur Anlagerung an ihr Substrat eine freie Carboxylgruppe nötig hat.

Das Enzym findet sich nach S. EDLBACHER und Mitarbeiter<sup>4</sup> in der Leber der Säugetiere, nicht dagegen der Vögel, aber in Niere und Hoden aller untersuchten Tiere in reicher Menge, während es in Ovarien fast ganz zu fehlen scheint. Aus der Tatsache, daß der Arginingehalt der Organe männlicher Tiere den der weiblichen stets weit übertrifft, schließt EDLBACHER<sup>4</sup>, daß die männlichen Individuen einen gegenüber den weiblichen stark gesteigerten hydrolytischen Argininumsatz besitzen und daß der Argininstoffwechsel zur Sexualität in Beziehung steht. Auch in Pflanzen ist die Arginase zufolge A. KIESEL<sup>5</sup> weit verbreitet.

<sup>1</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ und F. STEIGERWALDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 195, 260.

<sup>2</sup> A. KOSSEL u. H. D. DAKIN: Zeitschr. physiol. Chem. 1904, 42, 181.

<sup>3</sup> S. EDLBACHER u. H. BURCHARD: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 194, 69.

<sup>4</sup> S. EDLBACHER u. P. BONEM: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 145, 69.

<sup>5</sup> A. KIESEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1909, 60, 460; 1922, 118, 267.

α) Messung der Arginase. Zur Messung der Arginasewirkung verwendet man nach S. EDLBACHER<sup>1</sup> zweckmäßig ein Verfahren, das auf der quantitativen Zerlegung des frei gewordenen Harnstoffs durch Urease und auf der titrimetrischen Ermittlung der entstandenen Menge Ammoniak nach FOLIN (vgl. dazu die Bestimmung der Urease, S. 782) beruht.

Benötigte Lösungen. 1%ige Arginincarbonatlösung; Glykokoll-Natronlauge-Natriumchlorid-Puffer nach SÖRENSEN von  $p_H = 9,5$ , 0,1 mol.

Der Ansatz besteht aus 10 ccm Argininlösung und 5 ccm der Pufferlösung. Diese beiden Lösungen werden in das Reaktionsgefäß der FOLINSchen Apparatur gegeben und im Thermostaten bei 38° zum Temperaturnausgleich belassen. Hierauf fügt man dem Gemisch die Enzymlösung zu, z. B. 0,1 ccm Glycerinextrakt 1:3 aus frischer Leber und füllt mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 ccm auf. Die Einwirkungsdauer beträgt 1 Stunde. Nach dieser Zeit wird zur raschen Abbrechung der Enzymwirkung mit n-Schwefelsäure auf etwa  $p_H = 4,0$  (Methylrot als Indicator) gebracht und das Reaktionsgefäß zur Zerstörung des Enzyms 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wird das Reaktionsgemisch mit n-Natronlauge auf  $p_H = 7,0$  eingestellt, 2 ccm 0,5 Mol. Phosphatpuffer von  $p_H = 7,0$  und 100 mg Ureasepulver (gut wirksames Soja- oder Jackbohnenmehl) zugegeben und 1 Stunde bei 38° belassen.

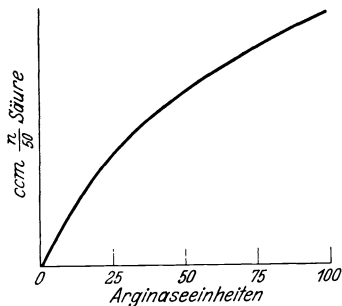


Abb. 16. Arginasemenge und Umsatz.

Nach der Spaltung des Harnstoffes wird das Reaktionsgemisch mit 1 ccm konzentrierter Natronlauge (30% ig) alkalisch gemacht und nach Zusatz von einigen Tropfen Octylalkohol das Ammoniak in der FOLINSchen Apparatur mittels eines kräftigen Luftstromes in die mit 0,02 n-Schwefelsäure beschickte Vorlage übergetrieben und dann durch Titration mit 0,02 n-Natronlauge unter Benutzung von Methylrot als Indicator bestimmt.

Als Arginaseeinheit wird diejenige Menge von Enzym bezeichnet, die unter den obigen Bedingungen in 60 Minuten bei 38° eine Menge Harnstoff bildet, die bei der Zerlegung mit Urease 0,34 mg Ammoniak (d. i. 1 ccm 0,02 n-Schwefelsäure) liefert. Die Enzymmenge ist

zwischen 4–30 Arginaseeinheiten zu bemessen. Die Beziehungen zwischen Enzymmenge und Umsatz gibt die Kurve der Abb. 16 wieder.

Nach neuen Untersuchungen von S. SALASKIN und SOLOWJEW<sup>2</sup>, sowie von WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern<sup>3</sup> unterliegt die Arginase der Aktivierung durch Sulphydrylverbindungen; man wird danach bei Arginasebestimmungen den Aktivierungszustand des Enzyms berücksichtigen müssen.

β) Gewinnung von Arginasepräparaten<sup>1</sup>. Ganz frische Kalbsleber, in der Fleischmaschine zerkleinert, wird mit der dreifachen Menge Glycerin unter häufigem Schütteln 36 Stunden extrahiert, dann durch eine mehrfache Lage von Mull coliert und der Extrakt abzentrifugiert. Dieser rohe Glycerinextrakt, der auch alle anderen Enzyme enthält, ist haltbar.

Darstellung eines Trockenpräparates. Frische Kalbsleber wird durch die Fleischmaschine getrieben und der Organbrei mit Kieselgur am besten mit den Händen vermengt, so daß das Ganze eine sich gerade nicht mehr zusammenballende Masse bildet. Diese wird in ein Tuch eingeschlagen und an der BUCHNER-Presse bei 300 Atmosphären Druck ausgepreßt. Der vollkommen klare rohe Preßsaft wird unter starkem Rühren in die zehnfache Menge Aceton eingetropt, dreimal mit Aceton dekantiert, sofort energisch abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es muß vermieden werden, das Ferment länger als nötig mit dem Lösungsmittel in Berührung zu lassen. Zur Bereitung einer Fermentlösung verreibt man dann z. B. 1 g Fermentpulver mit 100 ccm Wasser, läßt unter Toluol 12 Stunden bei 38° stehen und filtriert. 1 ccm einer solchen Lösung enthält z. B. 46 Arginaseeinheiten.

EDLBACHER und SIMONS<sup>4</sup> ist es gelungen, den Enzymwert gegenüber dem rohen Glycerinauszug mittels Adsorptionsmethoden auf etwa das 30fache zu

<sup>1</sup> S. EDLBACHER u. RÖTHER: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 148, 264.

<sup>2</sup> S. SALASKIN u. L. SOLOWJEW: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 200, 259.

<sup>3</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. SCHÄFFNER u. W. KOCHOLATY: Naturwiss. 1931, 19, 964; 1933, 21, 848.

<sup>4</sup> E. EDLBACHER u. E. SIMONS: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 167, 76.

erhöhen. Die Trennung von proteolytischen Enzymen wird ebenfalls von EDL-BACHER<sup>1</sup> mittels Adsorption herbeigeführt.

Kalbsleberglycerinextrakt (1:3) wird mit der vierfachen Menge Wasser verdünnt und mit Aluminiumhydroxyd C $\gamma$  adsorbiert, und zwar wird auf 100 ccm verdünnten Extraktes 12 ccm Tonerdesuspension (= 0,276 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) verwendet. Die Restlösung ist zufolge der Prüfung frei von Peptidasen.

Nach H. FINKELSCHERER<sup>2</sup> ist die Abtrennung der proteolytischen Enzyme durch Tonerde C $\gamma$  meist nicht so quantitativ, daß sich nicht bei empfindlicher Prüfung noch eine nennenswerte Erepsinwirkung nachweisen ließe. Er vervollständigt daher die Abtrennung durch Vergiftung mit Blausäure oder Schwefelwasserstoff, wobei die Arginase kaum geschädigt, die ereptischen Enzyme aber vollkommen und irreversibel zerstört werden. Die Restlösung nach dreimaliger Tonerdeadsorption bei p<sub>H</sub> = 4,0 wird mit Blausäurelösung (Kaliumcyanid, neutralisiert mit Schwefelsäure) bis zu einer Konzentration von 0,05 n versetzt. Nach 1–2stündigem Stehen wird bei p<sub>H</sub> 4 die Blausäure durch einen kräftigen Luftstrom vertrieben.

#### 4. Asparaginase.

Die Asparaginase spaltet aus Asparagin unter Sprengung der Säureamidbindung Ammoniak ab. Das Enzym wirkt nach W. GRASSMANN<sup>3</sup> nur auf freies Asparagin; Asparagin, gebunden etwa in Eiweißkörper, wird nicht angegriffen, ebensowenig wie Chloracetyl-1-asparagin und Glycyl-1-asparagin. Das Enzym findet sich nach CLEMENTI<sup>4</sup> in der Leber einzelner Omnivoren (Schwein, Ratte); W. GRASSMANN isoliert es in enzymatisch einheitlicher Form aus der Hefe. Die Wirkung der Asparaginase wird ermittelt durch den Aciditätszuwachs in alkoholischer Lösung nach der Enzymwirkung.

Darstellung einer AsparaginaseLösung aus Hefe nach GRASSMANN. 100 g Frischhefe werden mit Toluol und etwa 150 g Wasser versetzt, verflüssigt und während einer Stunde durch Zusatz von Ammoniak neutral gehalten. Die Hefemasse wird dann von der Lösung abgetrennt, in der Zentrifuge gewaschen, mit Wasser zu einem Volumen von 100 ccm suspendiert, durch Zusatz von Ammoniak auf etwa p<sub>H</sub> = 8,5 eingestellt und bei dieser Reaktion erhalten. Die nach 48 Stunden abgetrennte Lösung war wirkungslos gegenüber Leucylglycin und nur wenig wirksam gegenüber Leucyldiglycin, zeigte aber die normale Asparaginasewirkung; z. B. geben 0,4 ccm der Enzymlösung bei der Einwirkung auf 0,1 Millimol 1-Asparagin und einem p<sub>H</sub> = 7,8 (durch 0,2 n-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer eingestellt) im Volumen von 2 ccm nach 2 Stunden (40°) einen Aciditätszuwachs von 1,45 ccm 0,05 n-Kalilauge, entsprechend 72% Spaltung.

#### 5. Purinamidasen.

Die Purinamidasen vollziehen die Desamidierung der aus den Nucleinsäuren stammenden Aminopurine, Adenin und Guanin, zu Hypoxanthin bzw. zu Xanthin. Eine enzymatische Desamidierung führt außerdem schon die Nucleotide, Adenylsäure und Guanylsäure, sowie die Nucleoside Adenosin bzw. Guanosin in die desamidierten Produkte über.

Die Purinamidasen finden sich in den Organen Leber, Milz, Niere zusammen mit den Nucleasen und den Purindehydrasen (vgl. S. 814), die bei Sauerstoffzutritt Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Harnsäure oxydieren. Außerdem kommt nach EMBDEN<sup>5</sup> den Desamidasen bei der Muskelkontraktion hohe physiologische Bedeutung zu; sie können deshalb aus Muskeln gewonnen werden. Die Trennung der Desamidasen untereinander, sowie die Isolierung von ihren

<sup>1</sup> E. EDL-BACHER u. H. BURCHARD: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **194**, 69.

<sup>2</sup> E. FINKELSCHERER: Dissert. München 1928.

<sup>3</sup> W. GRASSMANN: Untersuchungen über die Spezifität proteolytischer Pflanzenenzyme. Habilitationsschrift, München 1928.

<sup>4</sup> A. CLEMENTI: Arch. internat. Physiol. 1922, **19**, 368.

<sup>5</sup> G. EMBDEN u. G. SCHMIDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **186**, 205.

natürlichen enzymatischen Begleitern ist von G. SCHMIDT vor kurzer Zeit begonnen und zum Teil durchgeführt worden<sup>1</sup>. Nach diesem Forscher ist es wahrscheinlich, daß die Purindesamidasen streng spezifisch wirken, daß man also zu unterscheiden hat zwischen einer Adenylsäuredesamidase, Adenosindesamidase, Adenase, Guanylsäuredesamidase usw.

Messung der Purinamidasewirkung. Die Wirkung der Purinamidasen verfolgt man nach G. SCHMIDT am besten durch die Bestimmung des abgespaltenen Ammoniaks auf die verschiedenen Substrate. In anderen Fällen, wo es auf die Erfassung der Spaltprodukte mit dem Purinkern ankommt, ist der Gehalt des Reaktionsgemisches an Aminopurinen und Oxyapurinen nach dem Verfahren von A. KOSSEL<sup>2</sup> zu bestimmen.

Adenylsäuredesamidase. Die optimale Wirksamkeit besitzt das Enzym bei  $p_H = 5,9$ . Zwischen Enzymmenge und Umsatz herrscht Proportionalität, so daß die gemessenen Mengen abgespaltenen Ammoniaks in einer bestimmten Zeit zugleich als Maß für die Enzymwirkung gelten können.

Ausführung. 3 ccm Adenylsäurelösung, die 10 mg mit Natronlauge neutralisierte Adenylsäure enthält, werden mit 10 ccm 0,1 n-Phosphat-Puffer von  $p_H = 5,9$  und mit Enzymlösung (z. B. 4 ccm eines vorher vorsichtig auf  $p_H = 5,9$  eingestellten Extraktes) versetzt. Nach der Einwirkungsdauer von 30 Minuten bis zu mehreren Stunden wird die Enzymwirkung durch Zugabe von 4 ccm 4%iger Salzsäure unterbrochen. Zur Bestimmung des Ammoniaks wird die Flüssigkeit mit wenigst möglich Wasser in Rundkolben von 500 ccm übergeführt. Die Alkalisierung der Flüssigkeit erfolgt durch eine wäßrige Suspension von Magnesiumoxyd, welches in den verwendeten 15 ccm 2 g Magnesiumoxyd enthält. Das Volumen der gesamten Flüssigkeit wird möglichst niedrig gehalten (40–50 ccm). Hierauf wird im Vakuum bei einer Badtemperatur von nicht über 38°, möglichst in einem Apparat mit eingeschlifenen Glasstopfen, in eine Vorlage von 10 ccm 1/300 n-Schwefelsäure überdestilliert. Die Titration erfolgt mit 1/300 n-Kalilauge unter Benutzung von 0,5 ccm eines Methylrot-Methylenblaugemisches nach TASHIRO<sup>3</sup> (3 Teile gesättigte Methylrotlösung in 50 Vol.-% Alkohol und 1 Teil Methylenblaulösung, in 100 ccm 50% Alkohol 0,025 g Methylenblau enthaltend). Als Umschlagpunkt gilt der Übergang von Fahlgrün in leuchtendes Grün. Verwendung von kohlensäurefreiem Wasser zu allen Operationen ist erforderlich.

Ähnlich wird die Wirkung von Organ- bzw. Muskelextrakten auf andere Aminopurinderivate gemessen<sup>4</sup>.

Gewinnung von Enzymlösungen. Preßsäfte aus Muskulatur und Organen enthalten die darin vorkommenden Desamidasen. Nach G. SCHMIDT finden sich Adenylsäuredesamidase und Adenosindesamidase im Preßsaft der Muskulatur (Kaninchen) fast frei von adenin-, guanylsäure-, guanosin- und guaninspaltenden Enzymen. Die beiden Enzyme können durch Adsorption mit Tonerde C  $\gamma$  getrennt werden. Die adenosinspaltende Komponente bleibt frei von dem begleitenden Enzym in der Restlösung, während die andere Komponente sich in der Elution mit alkalischem Phosphat angereichert vorfindet. Das adenylsäurespaltende Enzym läßt sich außerdem leicht aus der Muskulatur mit schwachen Alkalien oder Säuren frei von der Adenosindesamidase extrahieren.

Zu diesem Zwecke wird die frische Muskulatur eines Kaninchens durch die Fleischmaschine getrieben und mit dem dreifachen Volumen einer 2%igen Natriumbicarbonatlösung bei Zimmertemperatur 1½ Stunden geschüttelt. Dann wird durch ein großes Faltenfilter filtriert, wobei das Filtrat mit Toluol überschichtet wird. Der Extrakt ist nach dem Neutralisieren stark wirksam.

Die Darstellungsmethode der Bicarbonatextrakte kann durch Vorextraktion der Muskulatur mit isotonischer Natriumchloridlösung verbessert werden; die Ammoniakmenge der Fermentlösung ist dann so gering, daß sie beinahe vernachlässigt werden kann, während sonst die Ammoniakabspaltung im Organ und Muskelbrei sehr erheblich ist

<sup>1</sup> G. SCHMIDT: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, **179**, 243.

<sup>2</sup> A. KOSSEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1884, **8**, 404.

<sup>3</sup> TASHIRO: Amer. Journ. Physiol. 1920, **60**, 519.

<sup>4</sup> G. EMBDEN u. H. SCHUMACHER: Pflügers Arch. 1929, **233**, 487.

und in Abzug gebracht werden muß. Man verwendet nur die hellen Anteile der Kaninchenmuskulatur, welche nach dem Zerkleinern in der Fleischmühle in dem 4—5fachen Volumen 0,85% Natriumchloridlösung aufgeschwemmt und etwa eine halbe Stunde geschüttelt werden. Nach dem Absaugen wiederholt man die Prozedur noch dreimal. Der schließlich resultierende, völlig ungefärbte Rückstand wird nun in dem Dreifachen des ursprünglichen Muskelgewichtes entsprechenden Volumen 2%iger Natriumbicarbonatlösung aufgeschwemmt und etwa eine Stunde lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach dem Abstumpfen der alkalischen Reaktion mit 10% Essigsäure filtriert man durch Faltenfilter.

3 ccm einer solchen Enzymlösung geben z. B. bei Einwirkung auf 10 mg Adenylsäure in 90 Minuten bei 37° 0,464 mg Ammoniak, was über 90% der theoretischen Menge beträgt.

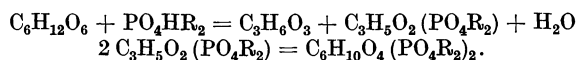
In Leber und Niere kommen Desamidasen aller Art vor. Sie lassen sich in ähnlicher Weise durch Extraktion mit Bicarbonatlösung gewinnen, oder aber es wird durch Zerfriren des Organes in flüssiger Luft ein Organbrei hergestellt, der direkt zur Verwendung kommt und stark wirksam ist.

### III. Enzyme des Energiestoffwechsels.

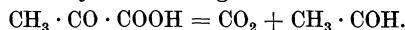
#### A. Enzyme der Gärung.

##### 1. Enzymsystem der alkoholischen Gärung.

Die Vergärung von Zucker zu Kohlensäure und Alkohol setzt sich aus einer Reihe von nur zum Teil bekannten Reaktionen zusammen. Die Gärung wird durch eine Phosphorylierung des Zuckers eingeleitet. Zum Zustandekommen der Gärung ist deshalb die Anwesenheit von Phosphat unbedingt nötig. Unter Vermittlung der Phosphatase und Phosphatase vollzieht sich nach EULER die Bildung und der Zerfall von Hexosediphosphat. Durch die Phosphorylierung ist offenbar die Möglichkeit zu einer Teilung des Hexosemoleküls in 2 C<sub>3</sub>-Ketten gegeben: EULER<sup>1</sup> formuliert diesen Vorgang nach folgender Gleichung:



Den weiteren Verlauf der Gärung hat dann C. NEUBERG in seinem bekannten Gärungsschema (vgl. Bd. I, S. 757) zusammengefaßt. Der Grundzug dieses Schemas besteht in der Annahme, daß Methylglyoxal als reaktionsfähiges Zwischenprodukt auftritt. Alle weiteren Umwandlungen sind als eine wiederholte CANNIZZAROSCHE Umlagerung des Methylglyoxals aufzufassen, die durch Vermittlung eines Enzyms, das EULER<sup>2</sup> Mutase nennt und dessen Wirkung an die Gegenwart eines Aktivators, der Co-Zymase, geknüpft ist, zustande kommt. Die durch Mutation des Methylglyoxals auftretende Brenztraubensäure wird ferner nach C. NEUBERG<sup>3</sup> durch das Ferment Carboxylase in Kohlensäure und Acetaldehyd nach folgender Gleichung gespalten:



Zu dem bis vor kurzem bekannten Enzymsystem der Gärung tritt neuerdings ein von K. LOHMANN<sup>4</sup> aufgefundener notwendiger Zusatzstoff für die Gärung, nämlich Magnesiumsalz.

Nomenklatur der Gärungsenzyme. Im folgenden wird nach einem Vorschlag von NEUBERG und EULER<sup>5</sup> unter Zymase, der von allen Aktivatoren befreite, rein enzymatische Bestandteil des Enzymsystems der alkoholischen Gärung, unter Holozymase, das gesamte Enzymsystem der alkoholischen Gärung, also Zymase + sämtliche Aktivatoren, unter Apozymase endlich,

<sup>1</sup> H. v. EULER: Biokatalysatoren, Stuttgart 1930; Svensk kem. T. 1925, 37.

<sup>2</sup> H. v. EULER u. K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 165, 28.

<sup>3</sup> C. NEUBERG u. L. KARCAJ: Biochem. Zeitschr. 1911, 36, 72.

<sup>4</sup> K. LOHMANN: Naturwiss. 1931, 19, 180; Biochem. Zeitschr. 1931, 237, 445.

<sup>5</sup> C. NEUBERG u. H. v. EULER: Biochem. Zeitschr. 1931, 240, 245.

die von Co-Zymase befreite Holozymase, verstanden. Die Apozymase enthält also u. a. noch das mit Wasser nicht auswaschbare Magnesium der Hefe und wird durch Zusatz von reiner Co-Zymase zur Holozymase ergänzt.

## 2. Messung der alkoholischen Gärung.

Die alkoholische Gärung kann auf zwei verschiedenen Wegen gemessen werden; man kann die Menge der durch die Gärung abnehmenden gärfähigen Zucker analytisch ermitteln, entweder mittels Polarimetrie oder mittels chemischer Methoden, z. B. nach BERTRAND oder nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL, oder aber man kann die Menge der auftretenden Gärprodukte, Kohlendioxyd und Äthylalkohol, messen. Die einfachste und meist genaueste Methode zur Bestimmung der Gärung besteht in der volumetrischen Messung des auftretenden Kohlendioxyds.

Nach WILLSTÄTTER und STEIBELT<sup>1</sup> wird die Kohlensäurebestimmung so ausgeführt, daß das bei der Gärung entstehende Gas aus kleinen Gasometern Quecksilber verdrängt, das in einen Meßzylinder abfließt. Der Gasometer besteht, wie Abb. 17 zeigt, in einer umgedrehten, mit einem Gummistopfen und Drahtligatur verschlossenen Saugflasche A. Sie ist durch einen Druckschlauch mit dem beweglichen Glasrohr B verbunden, von dem ein nach unten umgebogenes Ablaufrohr abzweigt ist. Durch den Gummistopfen ist das mit einem Glashahn versehene Rohr C bis ganz oben in den möglichst vollständig mit Quecksilber gefüllten Gasometer eingeführt. Das obere Ende der Glasröhre muß zur Seite gebogen sein, damit, wenn einmal Quecksilber hineingelangt, dieses durch Neigen des Apparates durch den Hahn abgelassen werden kann. Der Apparat wird durch B mit Quecksilber gefüllt; er wird, während der Hahnstopfen entfernt ist, mit dem Gärkolben verbunden. Der Druck ändert sich beim Auffangen der Kohlensäure lange Zeit nur wenig, später wird er durch Neigen des beweglichen Rohres B ausgeglichen.

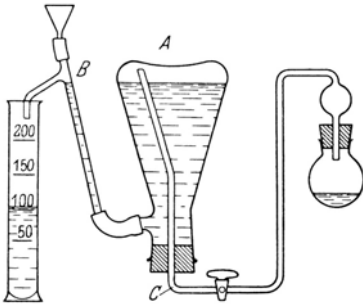


Abb. 17. Apparat zur Messung der alkoholischen Gärung nach WILLSTÄTTER.

Die Bedingungen der Gärungsbestimmung nach WILLSTÄTTER sind: 20 ccm einer 5%igen Lösung von Glucose mit einer 0,2 g trockener Hefe entsprechenden Menge frischer Hefe; Sättigung der Lösung mit Kohlensäure bei der Versuchstemperatur; Anwendung von Nährstoffen; gelindes Schütteln des Gärgefäßes in einen Wasserthermostaten (30°). Als Nährstoffe werden auf 0,2 g wasserfreie Hefe folgende Zusätze verwendet: 0,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g Acetamid oder 0,25 g Pepton 0,025 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und 0,01 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .

Als Maßeinheit für die Gärwirkung dient die Halbgärzeit, d. h. die Anzahl Minuten, die zur Entbindung von 50% der theoretischen Kohlensäuremengen unter den angegebenen Bedingungen nötig sind. Die Halbgärmenge der Kohlensäure bei 20° und 760 mm Druck beträgt für den Gäransatz 144 ccm.

H. EULER<sup>2</sup> empfiehlt die Gärwirkung in einem Apparat mit kleinen Dimensionen und mit kleineren Substratmengen zu messen.

Als Gärgefäße A werden kurze Reagensgläser von etwa 15 ccm Inhalt verwendet. Die Röhren sind mit Gummistopfen an starkwandigen Capillaren befestigt (Abb. 18). Sie sind so aufgehängt, daß sie ganz in das Thermostatenwasser (30°) eintauchen. Die Gärungsgefäße werden während der ganzen Versuchszeit geschüttelt. Sie sind durch die Capillarröhren C und Gummiligaturen mit Glasbüretten verbunden. Ihr Volumen beträgt 25 ccm und die Ablesung ist auf 0,05 ccm genau. Als Sperrflüssigkeit wird Quecksilber verwendet. Die Gärung geht bei Unterdruck vor sich, d. h. das Niveaugefäß wird so aufgehängt, daß die Quecksilberoberfläche in der Bürette etwa 5 ccm höher steht. Vor dem Versuch überzeugt man sich, daß die Apparatur vollkommen luftdicht ist. Beim Versuchsbeginn wird die Flüssigkeit ins Rohr gebracht, die Hefe zugesetzt, das Rohr am Pfropfen gut befestigt. Nach Schütteln bei Unterdruck während ein paar Minuten wird mit dem Niveaugefäß die Queck-

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. W. STEIBELT: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 115, 221.

<sup>2</sup> K. MYRBÄCK u. H. v. EULER in „Methodik der Fermente“, herausgegeben von C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN. Leipzig 1929, S. 1297.

silberoberfläche auf die Nullmarke eingestellt. Man schüttelt die ganze Zeit mechanisch und liest etwa jede viertel Stunde die entwickelte Kohlensäuremenge ab. Diese wird also bei Atmosphärendruck und mit dem natürlichen Feuchtigkeitsgehalt gemessen.

Die Gäransätze sind z. B. bei der Verwendung von Trockenhefe in folgendem Verhältnis zusammengestellt: 1 g Trockenhefe, 1 g Glucose, 0,02 g Natriumzymophosphat, das Ganze aufgefüllt auf 20 ccm unter Zusatz von soviel Phosphat-Puffer von  $p_H = 6,3$ , daß die endgültige Konzentration 2,5% beträgt. Die Gärgeschwindigkeit dieser Mischung kann mit nur 2 ccm noch sehr exakt bestimmt werden. Auch EULER verwendet als Maß für die Gärgeschwindigkeit die Halbgärungszeit.

Das  $p_H$ -Optimum für frische Hefe ist ziemlich breit, nämlich zwischen 4—6,5, für Trockenhefe ist dagegen die Einstellung der Acidität wichtiger, denn das  $p_H$ -Optimum ist schmal; es liegt zwischen 6,3 und 6,6<sup>1</sup>.

Will man die Menge vergärbaren Zuckers bestimmen, so muß man die Selbstgärung der Hefe berücksichtigen. Eine Parallelprobe mit Wasser statt Zuckerlösung muß über die Größe der durch Selbstgärung entwickelten Kohlensäuremenge Aufschluß geben. Die von der Selbstgärung herrührende Kohlensäure wird von der im Hauptversuch gewonnenen abgezogen. Man kann die Selbstgärung dadurch vermindern, daß man die Hefe vor dem Versuch in wäßriger Aufschlämmung so lange z. B. bei 30° hält, bis aus ihr keine Kohlensäure entweicht. Besser als bei frischer Hefe gelingt es bei Trockenhefe, ein Präparat darzustellen, das keine Selbstgärung zeigt.

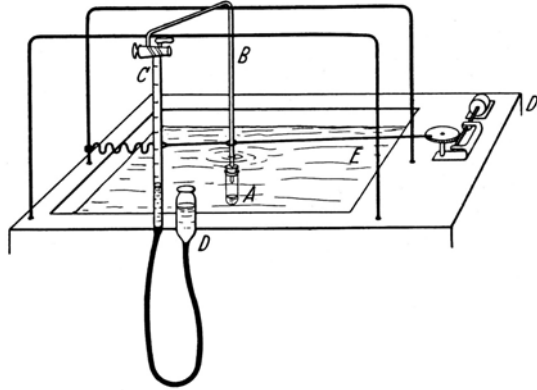


Abb. 18. Mikroapparat zur Messung der alkoholischen Gärung nach EULER.

### 3. Darstellung von Hefepreßsaft und Trockenhefe.

α) Hefepreßsaft nach BUCHNER. Die Gärungsenzyme sind auch im zellfreien Hefepreßsaft wirksam, wenngleich ziemlich schwach. Nach BUCHNER<sup>2</sup>, der als erster die Gärung im Preßsaft beobachtete, verfährt man zu seiner Gewinnung folgendermaßen:

Die aus der Brauerei bezogene Hefe wird gewaschen, indem sie auf ein Haarsieb gebracht und mit Wasser durch das Sieb hindurch in hohe Gefäße geschwemmt wird. Nachdem sich die Hefe zu Boden gesetzt hat, hebert man das darüberstehende Wasser ab. Dieser Waschprozeß wird 2—3mal wiederholt, bis das Waschwasser klar und farblos bleibt. Schließlich koltiert man die Hefe durch ein Nesseltuch auf einem Filtrierrahmen. Zur Entwässerung wird die Hefe in dem gefalteten und zusammengebundenen Koltiertuch in ein Preßtuch eingeschlagen und in der hydraulischen Presse 5 Minuten lang bei 50 Atmosphären Druck ausgepreßt. Die entwässerte Hefe (mit noch etwa 70% Wassergehalt) wird in einer großen Schale mit feinem Quarzsand und mit Kieselgur im Verhältnis 1000 g entwässerte Hefe, 1000 g Quarzsand und 200—300 g Kieselgur mit den Händen tüchtig gemengt und durch ein großes Sieb (9 Maschen auf 1 qcm) geschlagen. Zur Zerreibung kommt das staubtrockene, fast weiße Pulver hierauf in Portionen von 300—400 g in eine große Porzellanschale von 40 cm Durchmesser und wird solange zerrieben, bis die teigig gewordene Masse sich von selbst zusammenballt und von der Wandung der Reibschale ablöst, was für 200 bis 400 g 2—3 Minuten dauert. Zum Auspressen wird die Masse (entsprechend 1 kg Hefe) nunmehr in ein starkes, baumwollenes, nicht appetiertes Preßtuch (Segeltuch) eingeschlagen. Das Preßtuch wird vor dem Gebrauch mit kaltem Wasser gründlich durchtränkt

<sup>1</sup> H. v. EULER u. S. HEINZE: Zeitschr. physiol. Chem. 1919, 108, 165; 1923, 131, 179.

<sup>2</sup> E. BUCHNER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, 30, 117. — E. BUCHNER, H. BUCHNER u. M. HAHN: Die Zymasegärung. München 1903.



und in der hydraulischen Presse bei 50 Atmosphären Druck von dem Überschuß an Wasser befreit. Hierauf wird das Hefegemisch in der hydraulischen Presse bei einem bis auf 300 Atmosphären steigenden Druck ausgepreßt. Der abfließende Saft tropft durch ein Faltenfilter in ein in Eiswasser stehendes Gefäß. Aus 1 kg Hefe werden so gewöhnlich zwischen 450 und 500 ccm Preßsaft gewonnen. Der ausgepreßte Kuchen kann nochmals unter Zusatz von Wasser zerrieben und ausgepreßt werden. Der gewonnene Saft behält nur kurze Zeit seine Aktivität.

β) Trockenhefe<sup>1</sup>. Da die Bereitung von Hefepreßsaft erhebliche Schwierigkeiten machte und die Säfte nur einen kleinen Teil der Gärkraft der lebenden Hefe und noch dazu geringe Haltbarkeit besitzen, ist es in vielen Fällen von Nutzen, Trockenhefe bzw. Auszüge aus Trockenhefe zu machen, die fast unbegrenzt haltbar und deren enzymatische Wirkung während einiger Zeit konstant ist.

Zur Darstellung von Trockenhefe wird untergärende Bierhefe gut ausgewaschen, durch Zentrifugieren oder Kolieren von der Hauptmenge des Waschwassers befreit, bis zu einem Trockengehalt von wenigstens 30% gepreßt und dann durch ein Sieb mit etwa millimetergroßen Maschen getrieben. Die Hefe muß so trocken sein, daß sie nach dem Sieben nicht wieder zusammenklebt. Die gesiebte Hefe wird in dünner Schicht auf Filtrierpapier ausgebreitet und trocknet so bei Zimmertemperatur in etwa 48 Stunden. Die Trockenhefe, die gewöhnlich 5–7% Wasser enthält, ist in einer geschlossenen Flasche monatelang haltbar.

Mit diesem Hefepreparat kann man Gärungsversuche, wie früher beschrieben, ausführen. Bei der Gärung mit Trockenhefe ist oft beobachtet worden, daß die normale Geschwindigkeit erst nach einer gewissen Zeit einsetzt. Es ergab sich, daß in Anwesenheit der Hexosediphosphorsäure die Gärung unmittelbar einsetzt. Bei Arbeiten mit Trockenhefe ist deshalb ein Zusatz von Natriumzymbosphat notwendig.

Aus der Trockenhefe läßt sich nach LEBEDEV<sup>2</sup> leicht ein wirksamer Extrakt bereiten. 50 g Hefe werden zu diesem Zwecke mit der dreifachen Menge Wasser verrührt, bis die Mischung homogen wird, 2 Stunden im Thermostaten bei 35° oder 6 Stunden bei 25° aufbewahrt und durch ein Papierfilter filtriert. Das Filtrat ist am besten unter Eiskühlung aufzufangen.

γ) Acetondauerhefe nach BUCHNER<sup>3</sup>. Die Entwässerung der Hefe kann auch mittels Aceton erfolgen.

Frische ausgewaschene Brauereihefe wird bei einem Druck von 50–100 Atmosphären vom überschüssigen Wasser befreit, 500 g davon zwischen den Händen verrieben und auf ein Sieb (100 Maschen auf 1 qcm) verteilt. Nunmehr wird das Sieb in eine flache Schale, in der sich 3 Liter Aceton befinden, eingetaucht, und dann wird durch Heben und Senken des Siebes in der Flüssigkeit die Hefe unter Nachhilfe mit einem Bürstchen in 3–4 Minuten durch die engen Maschen geschwemmt. Die Hefe bleibt nach dem Eintragen unter häufigem Umrühren noch 10 Minuten im Aceton liegen. Hierauf wird nach kurzem Absitzen die Flüssigkeit größtenteils abgossen und die Hefe in einer Nutsche auf gehärtetem Filtrierpapier unter kräftigem Anpressen mit einem geeigneten Stempel möglichst trocken gesaugt. Den darauf grob zerkleinerten Hefekuchen übergießt man aufs neue in der Schale mit 1 Liter Aceton, rührt 2 Minuten durch und saugt die Flüssigkeit wieder auf der Nutsche möglichst vollständig ab. Die Masse wird dann grob gepulvert, in einer kleinen Schale mit 250 ccm Äther übergossen, 3 Minuten durchgeknetet und auf der Nutsche vom Äther befreit. Hiernach wird die Hefe auf Papier ausgebreitet,  $\frac{1}{2}$ –1 Stunde im Zimmer an der Luft gelagert und schließlich durch 24stündiges Erwärmen im Trockenschrank bei 45° völlig getrocknet. Die so gewonnene Acetondauerhefe stellt ein fast weißes staubtrockenes Pulver dar, das monatelang gut wirksam bleibt.

#### 4. Bestimmung und Isolierung von Co-Zymase.

Prinzip der Messung. Zur Messung und Untersuchung der Co-Zymase benötigt man co-zymasefreie Hefe oder Hefepreparate (Apozymase). Eine solche Hefe ist vollkommen wirkungslos gegenüber Zucker und wird durch

<sup>1</sup> K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 177, 158.

<sup>2</sup> A. v. LEBEDEV: Ann. Inst. Pasteur 1912, 26, 8.

<sup>3</sup> R. ALBERT, E. BUCHNER u. R. RAPP: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, 35, 2376.

Zugabe von Co-Zymase aktiviert, aus Zucker Kohlensäure abzuspalten, deren Entwicklungsgeschwindigkeit ein Maß für die Menge des zugegebenen Aktivators darstellt.

α) Darstellung von Apozymase. MYRBÄCK<sup>1</sup> empfiehlt die folgende Methode zur Darstellung der Apozymase:

Aus gewaschener Bierhefe wird etwa 1 kg Trockenhefe hergestellt und in einer geschlossenen Flasche aufbewahrt. Für jeden Versuch wird eine geeignete Menge (10 g) abgewogen, mit Wasser verrieben und quantitativ in eine geräumige Flasche übergespült. Die Flasche wird kräftig geschüttelt, die Hefe abzentrifugiert, wieder in Wasser suspendiert, geschüttelt und abzentrifugiert. Sie wird dann mit etwas Wasser aufgenommen, quantitativ in einen 100 cm-Meßkolben übergespült und je nach Wunsch mit Wasser oder Pufferlösung aufgefüllt.

Nach MEYERHOF<sup>2</sup> kann Apozymase aus Hefesaft oder Macerationssaft nach LEBEDEV (s. S. 792) durch Ultrafiltration erhalten werden. Zur Herstellung eines solchen Präparates verwendet man entweder eine ZSIGMONDYSche Nutsche, die aus Kollodium mit 96% Alkohol hergestellt ist oder am besten Ultrafilter nach BECHOLD. Der Hefesaft wird in den Apparat gebracht und mit Hilfe von komprimierter Luft oder komprimiertem Stickstoff ein Druck von 15 Atmosphären ausgeübt. Wenn kein Filtrat mehr durchläuft, wird der Rückstand auf dem Filter mit destilliertem Wasser, dessen Volumen wenigstens 100mal so groß ist, als das des ursprünglichen Hefesaftes gewaschen. Er bildet eine braune, zähe, in Wasser vollkommen lösliche Masse. Diese kann vom Filter abgekratzt und sofort verbraucht oder im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und längere Zeit aufbewahrt werden. Sehr aktive Hefesäfte erfordern mitunter noch längeres Auswaschen, ehe sie ganz inaktiv werden.

Durch Dialyse von Macerationssaft stellt aus co-zymasearmer obergäriger Trockenhefe BOYSEN-JENSEN<sup>3</sup> Apozymase dar. Der Extrakt wird in Kollodiumschläuchen, die nach der Methode von SÖRENSEN und HÖYRUP<sup>4</sup> hergestellt werden, dialysiert. Die Dialyse muß schnell — in weniger als 24 Stunden — erfolgen und bei einer Temperatur nicht über 5°. Zu diesem Zwecke wird die Flüssigkeit in dem Schlauch mechanisch gerührt und ein Strom von kaltem destilliertem Wasser (0,5 Liter je Stunde) durch einen den Schlauch umgebenden Mantel geleitet. Das Dialysat kann mit einem Gemisch von 8 Teilen 96%igen Alkohols und 4 Teilen Äther gefällt, abgesaugt, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet werden.

Das Apozymasepräparat muß vor der Benutzung auf Co-Zymasefreiheit geprüft werden. Ein solches Präparat soll in Gegenwart von Glucose, Phosphatlösung und Hexosediphosphat keine Gärung veranlassen. Mit Wasser eine Minute aufgekocht und dann einige Minuten bei 80° gehalten, soll die Apozymase einen Extrakt geben, der zusammen mit Apozymase keine Gärung bewirkt.

β) Bestimmung der Co-Zymase nach EULER<sup>5</sup>. Die Gärungsgeschwindigkeit, die durch Zusatz verschiedener Mengen Co-Enzyms zu einem Gemisch von Apozymase, Phosphat und Glucose hervorgerufen wird, ist der Konzentration des Co-Enzyms nur in gewissen Grenzen proportional; für Konzentrationen, die eine Geschwindigkeit von nicht mehr als 50% der maximalen hervorrufen, kann man die Geschwindigkeit der Konzentration proportional setzen. Die Bestimmungen werden also ausgeführt, indem man die Geschwindigkeit der Gärung, die durch die zu prüfende Co-Zymaselösung hervor-

<sup>1</sup> K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 177, 158.

<sup>2</sup> O. MEYERHOF: Zeitschr. physiol. Chem. 1918, 101, 165; 102, 1.

<sup>3</sup> P. BOYSEN-JENSEN: Biochem. Zeitschr. 1924, 154, 235.

<sup>4</sup> S. P. L. SÖRENSEN u. M. HÖYRUP: Compt. rend. du Lab. CARLSBERG: 1916, 12, 28.

<sup>5</sup> H. v. EULER u. S. KARLSSON: Zeitschr. physiol. Chem. 1922, 123, 93. — H. v. EULER u. K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 198, 219. — K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 177, 158.

gerufen wird, bei solcher Verdünnung feststellt, daß die obige Bedingung erfüllt ist.

Durch Versuche werden die Grenzen ermittelt, in denen die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung der Co-Enzymkonzentration proportional ist. EULER wendet bei 30° 0,2 g ausgewaschener Hefe in 1 ccm 5%igen Phosphatpuffers ( $p_H = 6,3$ ) und 1 ccm Co-Enzymlösung unter Zusatz von etwa 2 mg Zymophosphat an, wobei das Gesamtvolumen 2 ccm beträgt und 5% Glucose enthält. Bestimmung der Gärgeschwindigkeit nach S. 790.

Als Einheit für die Co-Zymasemenge (Co) wird die Menge angesehen, die unter gegebenen Bedingungen eine Kohlensäure-Entwicklung von 1 ccm je Stunde ergibt. Die Aktivität eines Präparates ist dann durch den Ausdruck

$$A_{Co} = \frac{\text{ccm CO}_2 \text{ je Stunde}}{\text{g Co-Zymasepräparat je ccm}}$$

gegeben. Die Kohlensäure-Entwicklung je Stunde wird für ein geeignetes Volumen des Co-Enzympräparates durch Beobachtungen, die sich über 1 bis 2 Stunden erstrecken, bestimmt und die im Kubikzentimeter enthaltenen Gramm fester Substanz durch Eindampfen eines aliquoten Teils und Wägen des Rückstandes ermittelt.

Zur Bestimmung der Co-Zymase sind immer frische Apozymasepräparate zu nehmen, da alte Präparate niedere Werte geben.

γ) Darstellung der Co-Zymase. Die Co-Zymase kann durch Dialyse oder Ultrafiltration von Hefesaft oder Macerationssaft erhalten werden, gewöhnlich gewinnt man sie aber durch Extraktion von Hefe mit siedendem Wasser. Zu diesem Zwecke wird Hefe in die gleiche Gewichtsmenge siedendem Wassers eingetragen, das Gemisch einige Minuten gekocht, abgekühlt und filtriert.

Für die Reinigung der Co-Zymase geben EULER und MYRBÄCK<sup>1</sup> folgende Vorschrift: Untergährige Bierhefe wird mit fließendem Leitungswasser möglichst von Würze befreit. Die Hefe darf während einiger Stunden absitzen, worauf der Brei portionsweise in eine, in einem größeren Kessel über einem großen Brenner befindliche kleine Menge Wasser verrührt wird. Die Temperatur soll während dieses Vorganges 80° betragen. Nach dem Erkalten wird der jetzt ganz dünn gewordene Hefebrei solange mit einer konzentrierten Bleiacetatlösung versetzt, bis eine abfiltrierte Probe nicht mehr gefällt wird. Es wird abzentrifugiert und mit etwas Wasser gewaschen. Zentrifugat und Waschwasser, die oft etwas trüb sind, werden vereinigt.

Man fällt nun das Blei durch tropfenweisen Zusatz einer konz. Natriumhydrosulfidlösung. Ab und zu wird etwas Schwefelsäure zugesetzt, damit sich der Sulfidniederschlag besser absetzt. Ist alles Blei gefällt und die Fällung flockig, so wird auf großen BÜCHNER-Trichtern abgesogen; man erhält eine ganz klare, gelbe Lösung, die bei richtiger Arbeit mehr als 80% der Co-Zymase des Ausgangsmaterials enthält. Sie soll nur wenig Schwefelwasserstoff enthalten und kann nötigenfalls gelüftet werden.

6 Liter einer auf diese Weise vorgereinigten Lösung wurden mit 30 g Aluminiumsulfat und hierauf mit soviel Ammoniak versetzt, daß Phenolphthalein stark gerötet wird. Der gewaschene Niederschlag wird in 500 ccm Wasser suspendiert und mit 10 ccm etwa 85%iger Phosphorsäure versetzt. Nach halbstündigem Schütteln wird abfiltriert und das Filtrat auf Co-Zymasegehalt untersucht. Die Elution ist in diesem Falle praktisch vollständig. Das überschüssige Phosphat in den Elutionen kann ohne allzu große Verluste an Co-Zymase mit Bariumhydroxyd gefällt werden. Dabei wird auch alles etwa in Lösung gegangene Aluminium entfernt. Die Elutionen werden mit konz. Lösungen von Bariumacetat und Baryt versetzt, bis bei neutraler bis sehr schwach alkalischer Lösung nichts mehr gefällt wird. Die Ausbeute ist im allgemeinen etwa 75%.

Zur weiteren Reinigung der Co-Zymase werden die phosphorsäurefreien, meist etwas bariumhaltigen Lösungen mit Quecksilbernitrat ausgefällt. (Die Lösung wird durch Sättigen von 4 n-Salpetersäure mit Quecksilberoxyd hergestellt.) Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat von Quecksilbersulfid wird gelüftet. In diesem Stadium haben die Co-Zymaselösungen aus normalem Hefekochsaft Reinheitsgrade von wenigstens  $A_{Co} = 20\,000$ . Sie werden mit Schwefelsäure angesäuert und solange mit Phosphorwolframsäure versetzt, als noch eine

<sup>1</sup> H. v. EULER u. K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 198, 219.

grobflockig rasch absitzende Fällung entsteht. (Die bei weiterem Zusatz von Phosphorwolframsäure entstehende, feinkörnige Fällung enthält keine Co-Zymase.) Der abzentrifugierte mit stark verd. Schwefelsäure gewaschene Niederschlag wird in 1%iger Schwefelsäure suspendiert und mit 1 Vol. Äther + 1 Vol. Amylalkohol 1 Stunde maschinell geschüttelt. Wenn nötig, wird wieder zentrifugiert. Der Teil des Phosphorwolframat, der sich bei dieser Behandlung nicht gelöst hat, enthält nur sehr wenig Co-Zymase. Die wäßrige Lösung wird noch ein paarmal mit Amylalkohol-Äther ausgeschüttelt, gelüftet und mit Bariumhydroxyd von Schwefelsäure befreit. Das Filtrat, das noch ganz schwach sauer sein soll, wird mit Silbernitrat versetzt, bis eine herausgenommene Probe mit Bariumhydroxyd unmittelbar eine braune Färbung gibt. Das mit Silbernitrat Ausgefällte wird abzentrifugiert und verworfen, das Zentrifugat mit Ammoniak zur maximalen Fällung versetzt. Der mit Wasser sorgfältig gewaschene Silberniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat gelüftet.

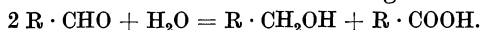
Die nach dieser Isolierungsmethode aus gutem Ausgangsmaterial gewonnenen Präparate haben ACo-Werte, die größer als 100000 sind. Solche Präparate enthalten nach EULER<sup>1</sup> fast ausschließlich Adenylsäure oder eine damit nahe verwandte Substanz.

δ) Co-Zymase aus Muskelkochsaft nach MEYERHOF<sup>2</sup>. Der fein zerschnittene Muskel (Hinterbeinmuskel von Fröschen oder Ratten) wird mit der gleichen Gewichtsmenge Wasser gekocht und der Auszug filtriert. Kochen ist notwendig, da die Extraktion in der Kälte einen inaktiven Extrakt ergibt, der durch späteres Kochen nur wenig aktiviert wird.

Co-Zymase aus Hefe ist nach LOHMANN<sup>3</sup> indes nicht identisch mit dem Präparat aus Muskel- der Adenylpyrophosphorsäure, die das Co-Enzym der Milchsäurebildung im Muskel darstellt. Beide Stoffe können sich gegenseitig nur zum Teil und nicht in allen Fällen ersetzen.

### 5. Aldehydmutase der Hefe.

Aldehyde erfahren durch Hefe (wie auch durch andere pflanzliche oder tierische Gewebe) eine CANNIZZAROSCHE Umwandlung nach folgender Gleichung:



Diese Wirkung ist enzymatischer Natur und wird hervorgerufen durch eine Aldehydmutase; sie ist nach EULER und Mitarbeitern<sup>4</sup> abhängig von der Anwesenheit der Co-Zymase. Es ist nach diesem Befund wahrscheinlich, daß die Mutase selbst eine Komponente der Zymasegruppe bildet, und daß die Co-Zymase bei der Gärung in eine Mutation eingreift<sup>5</sup>.

Nachweis der Mutasewirkung nach EULER und MYRBÄCK<sup>6</sup>. Das Reaktionsgemisch besteht aus 4 ccm 0,3 mol. Phosphatpuffer  $p_H = 6,5$  (dem Optimum der Mutasewirkung); 1 ccm Aldehydlösung (etwa 30 mg Aldehyd), 5 ccm Wasser. Dazu werden 0,5 bis 1 g Trockenhefe oder die entsprechende Menge Frischhefe in aufgeschlammtem Zustand gegeben. Die Mischungen werden in verschlossenen Flaschen bei 30° geschüttelt. Nach verschiedenen Zeiten (1—4 Stunden) wird 1 ccm herausgenommen und in 5 ccm etwa 0,05 n-Kaliumbisulfatlösung einpipettiert. Nach 15 Minuten wird mit 0,085 n-Jodlösung aus einer Mikrobürette zurücktitriert (Aldehydtitration nach RIPPER). Die Trockenhefe muß maximal mit Co-Zymase aktiviert sein.

Nach H. v. EULER und K. MYRBÄCK<sup>6</sup> ist die Hefemutase als identisch anzusehen mit der von BATELLI und STERN<sup>7</sup> beschriebenen Aldehydrase, ferner mit der Dehydrase von WIELAND<sup>8</sup>, der Dehydrogenase von THUNBERG<sup>9</sup>, sowie vermutlich auch mit dem SCHARDINGERSCHEN Enzym der Milch.

<sup>1</sup> K. MYRBÄCK u. H. v. EULER: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **198**, 236.

<sup>2</sup> O. MEYERHOF: Zeitschr. physiol. Chem. 1918, **101**, 165.

<sup>3</sup> K. LOHMANN: Biochem. Zeitschr. 1931, **237**, 445.

<sup>4</sup> H. v. EULER u. BRUNIS: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, **175**, 52.

<sup>5</sup> K. MYRBÄCK u. JAKOBI: Zeitschr. physiol. Chem. 1926, **161**, 245.

<sup>6</sup> H. v. EULER u. K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, **165**, 28.

<sup>7</sup> BATELLI u. STERN: Biochem. Zeitschr. 1910, **29**.

<sup>8</sup> WIELAND: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1914, **47**, 2085.

<sup>9</sup> THUNBERG: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) 1920, **40**, 1.

## 6. Wirkung von Magnesium-Ionen auf die alkoholische Gärung.

Ohne Magnesiumionen ist nach K. LOHMANN<sup>1</sup> keine Gärung möglich. Wäscht man Trockenhefe mit sauren Lösungsmitteln aus, z. B. dreimal mit der 50fachen Menge 0,1 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung, so ist die Gärkraft auch nach Zugabe von Co-Zymase und Hexose-di-phosphat verschwunden. Erst Zugabe von Magnesium-Ionen bewirkt eine Reaktivierung der Gärkraft. Das Optimum der Gärgeschwindigkeit liegt zwischen den Magnesiumkonzentrationen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  (auf 1 g Hefe etwa 1–3 mg Magnesium).

Nach EULER und Mitarbeiter<sup>2</sup> ist die Phosphorylierung diejenige Teilreaktion, in welche das Magnesium unmittelbar eingreift.

## 7. Phosphorylierung.

α) Darstellung von Hexosediphosphat. Die Hexosediphosphorsäure ist von HARDEN und YOUNG<sup>3</sup> im Jahre 1905 als ein Stoffwechselprodukt der Hefe aufgefunden worden. Nach C. NEUBERG und S. SABETAY<sup>4</sup> gestaltet sich die Darstellung des Hexosediphosphats folgendermaßen:

400 g Saccharose und 83 g Mononatriumphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ) werden in einer 8 Liter-Flasche in 2 Litern Wasser von 40° gelöst und zur Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration mit 22 g Natriumbicarbonat versetzt (das Aciditätsoptimum liegt zwischen  $\text{p}_\text{H} = 6,2$  und 6,6); dann werden 600 g Unterhefe (Oberhefen phosphorylieren schlechter) in der Lösung verteilt. Nach Zugabe von Toluol wird das Gemisch unter häufigem Umschütteln bei 37° aufbewahrt. Mit der bald einsetzenden Kohlensäureentwicklung beginnt die Veresterung. Sobald das gesamte vorhandene Phosphat in organische Bindung übergeführt worden ist, wird der Prozeß unterbrochen und die Isolierung der gebildeten Hexosediphosphorsäure vorgenommen.

Die Verminderung bzw. das Verschwinden des anorganischen Phosphates verfolgt man in Proben, die von Zeit zu Zeit so angestellt werden, daß man in je 2 ccm des Gemisches die Enzymwirkung durch Zufügen von 4 ccm 2,5%igem Ammoniak unterbricht, durch ein trockenes Filter gießt und 2 ccm des klaren Filtrates mit 3 ccm Magnesiummischung versetzt. Nach 5–7 Stunden erhält man keine Fällung mehr.

Bei gut phosphorylierenden Hefen erreicht man vollständige Phosphatbindung. Man muß darauf achten, daß die Zeit vollkommener Veresterung nicht überschritten wird, da später wieder eine Zerlegung des Diphosphates stattfindet.

Das schwachsaure Reaktionsgemisch wird alsdann mit etwa 2 n-Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und etwa 20 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt; darauf wird abzentrifugiert. Das Zentrifugat enthält hauptsächlich hexosediphosphorsaures Natrium neben geringen Mengen eines Hexosemonophosphats und verschiedene Verunreinigungen. Die Trennung der beiden Hexosephosphate kann man auf die verschiedene Löslichkeit ihrer Erdalkalisalze gründen. Die des Diphosphorsäureesters sind in kaltem Wasser mäßig, im heißen sehr schwer löslich, während die des Hexosemonophosphats sowohl im kalten als im heißen Wasser leicht löslich sind.

Zur Isolierung des Hexosediphosphats wird das klare Zentrifugat am besten in einem Rundkolben im Wasser- oder Kochsalzbad auf etwa 95° erwärmt und mit einer Lösung von 55 g wasserfreiem Calciumchlorid in 100 ccm kochendem Wasser gefällt. Möglichst heiß wird durch eine vorher angewärmte große Nutsche abgesaugt und mit wenig siedendem Wasser nachgewaschen. Zur ersten Reinigung des Rohproduktes wird eine Umfällung vorgenommen. Der gesamte feuchte Niederschlag wird in etwa 500 ccm 2 n-Essigsäure unter Zusatz von 250 ccm Wasser gelöst; dann wird klar filtriert und mit 2 n-Natronlauge gegen Lackmus genau neutralisiert. Nun wird 15 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt, wieder möglichst heiß abgesaugt und mit wenig kochendem Wasser nachgewaschen.

Das einmal umgefällte Salz enthält noch kleine Mengen von Calciumphosphat und aus der Hefe stammender Beimengungen, die man nach folgender Vorschrift entfernt: 10 g hexosediphosphorsaures Calcium werden in 64 ccm 2 n-Salzsäure unter Zusatz von 50 ccm Wasser in der Kälte gelöst. Ohne zu filtrieren, fügt man unter Eiskühlung 65–66 ccm 2 n-Natronlauge tropfenweise hinzu. Anorganische Phosphate und kleine Mengen von hexosediphosphorsäurem Calcium fallen dabei unlöslich aus, von letzterem jedoch nur wenig, da die in

<sup>1</sup> K. LOHMANN: Biochem. Zeitschr. 1931, 237, 445.

<sup>2</sup> Vgl. dazu H. ERDTMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 177, 211.

<sup>3</sup> A. HARDEN u. W. J. YOUNG: Proc. Chem. Soc. 1905, 21, 189.

<sup>4</sup> C. NEUBERG u. S. SABETAY: Biochem. Zeitschr. 1925, 161, 240.

der Kälte gebildeten Erdalkalisalze der Hexosediphosphorsäure in kaltem Wasser ziemlich löslich sind. Man saugt schnell ab und neutralisiert gegen Lackmus genau mit Salzsäure. Die klare Lösung wird nunmehr auf dem Wasserbade bis auf 90° erhitzt, wobei sich das in der Wärme schwer lösliche Calciumhexosediphosphat in gut filtrierbarer Form abscheidet. Es wird abgesaugt und auf der Nutsche mit heißem Wasser ausgewaschen. Das so bereitete Salz besteht aus mikroskopischen Kügelchen. Es ist etwas in kaltem und fast gar nicht in heißem Wasser löslich, leicht dagegen in Mineralsäuren und auch in Essigsäure oder Milchsäure. Wenn eine eisgekühlte Lösung in verdünnter Säure, nach gehöriger Verdünnung und Neutralisation durch Ammoniak, mit Magnesiamixtur keine Fällung gibt, ist das Salz rein.

Eine lösliche Modifikation, die für viele Zwecke, namentlich für enzymatische Versuche sehr brauchbar ist, gewinnt man auf folgende Art: Das reine hexosediphosphorsaure Calcium wird in möglichst wenig verdünnter Milchsäure gelöst und mit Ammoniak unter Eiskühlung bis zur deutlichen alkalischen Reaktion versetzt; man filtriert klar und fällt darauf mit Alkohol. Die amorphe und voluminöse Masse wird auf der Nutsche mit Alkohol bis zur Entfernung von Ammoniak und dem auch in starkem Alkohol leicht löslichem Ammoniumlactat gewaschen. Das Calciumsalz, das durch Absaugen von Alkohol befreit wird und nach dem Waschen mit Äther an der Luft getrocknet werden kann, löst sich glatt in Eiswasser. Aus dieser Lösung scheidet sich beim Erhitzen wiederum die obenerwähnte schwerlösliche und grobkörnige Modifikation aus.

Aus der unlöslichen Modifikation des Calciumsalzes kann man das lösliche Kaliumsalz dadurch bereiten, daß man eine wäßrige Suspension mit etwas weniger als der berechneten Menge Dikaliumoxalat digeriert. Hierzu ist die Unterstützung der Reaktion durch mechanisches Schütteln erforderlich. Das Ende der Umsetzung erkennt man an dem Verschwinden der Oxalationen.

β) Darstellung von Hexosemonophosphat nach NEUBERG und LEIBOWITZ<sup>1</sup>. Die Lösung von 100 g Saccharose in 1 Liter Macerationssaft aus Unterhefe wird bei Zimmertemperatur zur Angärung gebracht und dann eine etwa 20%ige Lösung von kristallisiertem Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ ) in kleinen Portionen so zugesetzt, daß beim Umschütteln an dem Blasenähler des Gäraufsatzes stets eine kräftige Kohlensäureentwicklung zu beobachten ist. Sowie 300 ccm der Phosphatlösung zugefügt sind, werden nochmals 100 g Zucker im Gärgemisch gelöst. Die Zugabe des Phosphats wird solange fortgesetzt, als eine Abnahme der Kohlensäurebildung beim Umschütteln wahrzunehmen ist. Der Versuch dauert 1½–2 Stunden und erfordert einen Zusatz von 100–150 g kristallisierten Dinatriumphosphates.

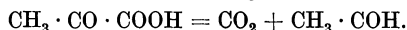
Die Isolierung des Monoesters wird dann derart vorgenommen, daß der ganze Ansatz mit heiß gesättigter Bariumhydroxydlösung genau neutralisiert und zur Koagulation des Hefeiweißes 20–25 Minuten im kochenden Wasserbade erhitzt wird. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wird der klare Saft in der Siedehitze mit der dem zugegebenen Phosphat äquivalenten Menge konz. Bariumacetatlösung versetzt, wodurch die Reste anorganischen Phosphates sowie auch der Hexosediphosphorsäure ausgefällt werden. Nun wird — wegen der größeren Löslichkeit des Bariumhexosediphosphats in der Kälte — möglichst heiß abgesaugt, mit wenig siedendem Wasser nachgewaschen und das Filtrat im FAUST-HEIM bei 37° auf etwa 800 ccm eingengt. Das Filtrat wird nun mit Bleiessig ausgefällt, die Fällung abzentrifugiert, in den Zentrifugenbechern wiederholt mit Wasser gewaschen. Der Bleiessigniederschlag wird darauf in einem Porzellanmörser mit Wasser zu einem dünnen Brei angerieben, die Suspension in eine Glasflasche übergespült, dann etwa 4 Stunden  $\text{H}_2\text{S}$  eingeleitet, dann das Filtrat von  $\text{H}_2\text{S}$  mittels Durchsaugen von Luft befreit. Man neutralisiert genau mit Bariumhydroxyd und beseitigt einen zuweilen auftretenden Niederschlag durch Filtration. Im FAUST-HEIM wird wieder auf 600–800 ccm eingengt. In der nötigenfalls filtrierten Flüssigkeit gibt manchmal normales Bleiacetat einen Niederschlag. Das Filtrat hiervon bzw. das durch Bleiacetat gar nicht fällbare Konzentrat wird nunmehr wieder durch

<sup>1</sup> C. NEUBERG u. J. LEIBOWITZ: Biochem. Zeitschr. 1927, 187, 481.

Bleissig ausgefällt. Die weitere Behandlung ist die gleiche wie oben. Aus der gegen Phenolphthalein mit alkalifreiem Barytwasser zu neutralisierenden Lösung fällt Alkohol (Vol. 1:1) ein jetzt schon recht reines hexosemonophosphorsaures Barium, das sich beim Stehen zusammenballt, gut absetzt und leicht auf der Nutsche abfiltriert werden kann; es ist sodann mit 50%igem und schließlich mit absolutem Alkohol auszuwaschen.

### 8. Carboxylase.

Die Carboxylase ist nach den Untersuchungen von NEUBERG und Mitarbeiter<sup>1</sup> ein Teilferment der Zymase. Sie katalysiert den Zerfall der Brenztraubensäure in Kohlensäure und Acetaldehyd nach folgender Gleichung:



Ebenso wirkt sie auf andere aliphatische und aromatische Ketonensäuren<sup>2</sup>. Die Brenztraubensäuregärung ist gegenüber der Zymasegärung durch ihre größere Widerstandsfähigkeit gegen alle äußeren Eingriffe gekennzeichnet. So kann man zymasefreie Carboxylase herstellen, wenn man Hefemacerationsaft 30 Minuten auf 54° oder 5 Minuten auf 60° erhitzt und von dem dabei ausgefallenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat enthält Carboxylase, während es auf Glucose nicht oder nur schwach einwirkt. Durch Fällung mit Aceton kann aus solchen inaktivierten Präparaten Carboxylase auch als Trockenpräparat hergestellt werden.

Auch gegen Gifte ist die Carboxylase weniger empfindlich als die Zymase. Während hinreichende Mengen Toluol oder Chloroform die Spaltung des Zuckers durch frische Hefen vollständig hemmen, wird die Carboxylase bei dieser Behandlung nicht geschädigt.

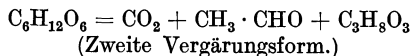
Die Carboxylase benötigt nach NEUBERG<sup>3</sup> keinen Zusatzstoff; auch cozymasefreie Hefepreparate zeigen deshalb Carboxylasewirkung.

Messung der Carboxylase. Zur Bestimmung der Carboxylasewirkung mißt man am besten die entwickelte Kohlensäuremenge, wozu die nämlichen Apparate dienen, wie sie zur Messung der Gärung angewendet werden. Bei zellfreien Gärungen wird zur Pufferung ein Gemisch von m-Brenztraubensäure und m-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> im Verhältnis von 2:3 angewandt (P<sub>H</sub> = 5,32–5,50)<sup>4</sup>.

Im übrigen kann man auch den entstandenen Acetaldehyd messen, wenn man ihn nur der weiteren Umsetzung (durch Zymase) entzieht; dies wird erreicht durch Zugabe von Natriumsulfit in das Gärgemisch (s. S. 799).

### 9. Vergärungsformen nach NEUBERG.

Durch Abfangen des bei der alkoholischen Gärung intermediär gebildeten Acetaldehyds gelingt es nach NEUBERG, die Reaktion in andere Bahnen zu lenken, entsprechend folgender Gleichung:



An Stelle des der Reaktion z. B. in Form seiner Bisulfitverbindung entzogenen Acetaldehyds tritt in diesem Falle gemäß dem NEUBERGSchen Gärungsschema ein anderer Wasserstoffacceptor aus der 3-Kohlenstoffreihe, das Methylglyoxal, als dessen Hydrierungsprodukt unter den Endprodukten der Reaktion Glycerin neben Kohlensäure und Acetaldehyd erscheint. Es ist gelungen, die

<sup>1</sup> C. NEUBERG u. L. KARZAY: Biochem. Zeitschr. 1911, **36**, 72.

<sup>2</sup> C. NEUBERG u. L. KARZAY: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, **115**, 211.

<sup>3</sup> C. NEUBERG u. P. ROSENTHAL: Biochem. Zeitschr. 1913, **51**, 141.

<sup>4</sup> C. NEUBERG u. MAY: Biochem. Zeitschr. 1923, **140**, 299.

zweite Vergärungsform bis zu 80% der theoretischen Möglichkeit durchzuführen; die restliche Zuckerspaltung findet daneben nach der ersten (normalen) Vergärungsform statt.

Nach NEUBERG und FÄRBER<sup>1</sup> sind im Gegensatz zur freien schwefligen Säure und den sauren Sulfiten die neutralen schwefligsauren Salze praktisch so ungiftig, daß auch in ihrer Gegenwart eine beträchtliche Zuckermenge durch eine kleine Hefemenge vollständig vergoren wird. Die Ausbeuten an Acetaldehyd und Glycerin stehen gemäß der angegebenen Gleichung im molekularen Verhältnis und sind von der Konzentration des angewandten Sulfit abhängig. Mit steigenden Mengen Natriumsulfit wird die Ausbeute an Aldehyd und Glycerin erhöht:

|  |         |                 |         |           |
|--|---------|-----------------|---------|-----------|
| 33 g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> auf 100 g Saccharose: | 11,90 g | Acetaldehyd und | 23,37 g | Glycerin. |
| 25 g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> „ 100 g „             | 13,89 g | „               | 27,61 g | „         |
| 150 g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> „ 100 g „            | 18,65 g | „               | 36,90 g | „         |

Die Benützung dieser Abfangmethode liefert so reiche Erträge an Glycerin, daß dieses Verfahren unter Umständen eine industrielle Gewinnung von Glycerin zuläßt<sup>2</sup>.

Beispiel eines Gäransatzes. 100 g Saccharose werden mit den üblichen Nährsalzen (1 g Ammoniumsulfat, 0,5 g Dinatriumphosphat, sowie etwas Kalium- und Magnesiumchlorid) in 500 ccm Wasser gelöst und mit 10 g obergäriger Hefe bis zur gerade deutlich einsetzenden Gärung bei 34° digeriert. Alsdann wird eine Auflösung von 33 g Dinatriumsulfit in 500 ccm Wasser hinzugefügt. Die Entwicklung von Kohlensäure hört wegen der Schädigung der Hefezellen durch das Salz, sowie infolge Bindung als Natriumbicarbonat vorübergehend auf, setzt aber nach 6—10 Stunden wieder ein. Bei 34° ist nach 6 Tagen in der Regel aller Zucker umgesetzt, kenntlich am Verschwinden der Drehkraft und des Reduktionsvermögens.

**Bestimmung der Endprodukte.** Acetaldehyd: Die ausgegorene, schwach alkalisch reagierende Maische wird zur Beseitigung der nicht gebundenen schwefligsauren Salze unter Eiskühlung mit einem Überschuß von Chlorbariumlösung versetzt. Im Filtrat befindet sich das lösliche Bariumsalz der acetaldehydschwefligen Säure. Zur Ermittlung des Acetaldehyds geht man in der Weise vor, daß der Acetaldehyd durch Destillation der Analysenflüssigkeit mit Calciumcarbonat aus dem Sulfitkomplex freigesetzt und dann titrimetrisch oder gravimetrisch bestimmt wird. Die Aldehydtitration wird nach RIPPER in der Modifikation v. FÜRTH<sup>3</sup> ausgeführt. Gravimetrisch kann man den Acetaldehyd durch Überführung in das p-Nitrophenylhydrazon bestimmen.

Glycerin. Die Glycerinbestimmung wird nach dem Prinzip von ZEISEL-FANTO-STRIETAR<sup>4</sup> vorgenommen. Es beruht auf der Überführung des Glycerins bei Behandlung mit siedender Jodwasserstoffsäure in Isopropyljodid und dessen Ermittlung an Hand seines Jodgehaltes. Um diese Methode anwenden zu können, müssen zunächst alle störenden Begleitstoffe aus der Maische entfernt werden. Zu diesem Zwecke wird das Gärgut zunächst aufgekocht und filtriert, das Filtrat mit Bariumchloridlösung gefällt, hierauf mit gesättigter Bariumhydroxydlösung versetzt und einige Zeit gekocht. Die Acetaldehyd-Bisulfitverbindung wird dabei zerlegt, das freiwerdende Sulfit gefällt und der abgespaltene Acetaldehyd verjagt. Nach vollendeter Zersetzung durch die Bariumhydroxydlösung sättigt man die Lösung mit Kohlensäure, filtriert und dampft bis zur Sirupdicke ein. Der Sirup wird nun mit Alkohol ausgezogen und der Alkoholextrakt von den ausgeschiedenen Salzen getrennt. Der nach möglichst vollkommener Vertreibung des Alkohols hinterbliebene sirupöse Rückstand wird jetzt in absolutem Alkohol gelöst und wiederum vom Ungelösten abfiltriert. Der im Vakuum konzentrierte Sirup löst sich nunmehr in absolutem Alkohol vollkommen auf, der Zusatz von Äther aber bewirkt nochmals eine Fällung, von der abfiltriert wird.

Nach Vertreibung des Alkohols und Äthers auf dem Wasserbade hat man eine weitgehend gereinigte Glycerinlösung in der Hand, von der in aliquoten Teilen Bestimmungen nach dem Jodidverfahren ausgeführt werden.

<sup>1</sup> C. NEUBERG u. E. FÄRBER: Biochem. Zeitschr. 1916, 78, 238. — C. NEUBERG u. E. REINFURTH: Biochem. Zeitschr. 1918, 89, 365.

<sup>2</sup> W. CONNSTEIN u. K. LÜDECKE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1919, 52, 1385.

<sup>3</sup> O. v. FÜRTH u. D. CHARNASS: Biochem. Zeitschr. 1910, 26, 207.

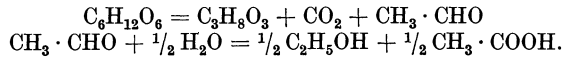
<sup>4</sup> Vgl. dazu C. NEUBERG u. E. REINFURTH: Biochem. Zeitschr. 1918, 92, 234.



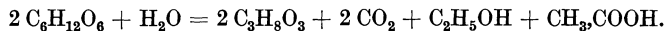
Eine direkte Gewinnung des Glycerins aus dem Gärgut gelingt durch Destillation mit überhitztem Wasserdampf im Vakuum nach NEUBERG und REINFURTH<sup>1</sup>.

Statt Natriumsulfit kann nach NEUBERG und Mitarbeitern<sup>2</sup> auch Dimedon (Dimethylhydroresorcin) zum Abfangen des Acetaldehyds benutzt werden.

Eine dritte Form<sup>3</sup> der Vergärung wird im alkalischen Milieu erzielt. Sie wird ausgedrückt durch folgende Formulierung:



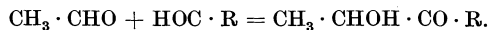
In der alkalischen Maische vollzieht sich also eine Dismutation des primär entstehenden Acetaldehyds, seine Menge nimmt aber ständig ab und ist zum Schlusse praktisch Null, so daß als Endformulierung für die dritte Vergärungsart die Gleichung gilt:



Da die basischen Zusatzmittel auf den Hefeorganismus schwächend einwirken, läßt sich ihre Anwendung nicht beliebig steigern. Die Toleranzgrenze liegt bei einer Menge, die eine Umsetzung nach der dritten Vergärungsart nur bis 35% gestattet; daneben findet die normale Zuckergärung statt. Als Alkalisatoren eignen sich am besten Natriumbicarbonat und Dikaliumphosphat.

## 10. Carboligase.

Mit den Spaltungsreaktionen, wie sie bei der alkoholischen Gärung auftreten, sind aufbauende Vorgänge eng verknüpft. NEUBERG<sup>4</sup> beschreibt eine enzymatische Wirkung der Hefe, die durch die Synthese von Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung gekennzeichnet ist; sie kommt nach der Zugabe von aliphatischen oder aromatischen Aldehyden zu gärenden Zuckerlösungen unter Zusammenschluß zweier Aldehydmoleküle — dem intermediär auftretenden Acetaldehyd und dem zugesetzten Aldehyd — zu einem Ketonalkohol nach folgender Gleichung zustande:



Nach Versuchen von NEUBERG und Mitarbeitern<sup>4</sup> erfolgt diese enzymatische Kondensation zweier Aldehyde mit Sicherheit nur dann, wenn der zur Reaktion verwendete Acetaldehyd nicht fertig zugefügt, sondern im System durch carboxylatische Spaltung erzeugt wird, sei es aus Zucker oder aus der direkten Vorstufe des Acetaldehyds, der Brenztraubensäure.

Die Carboligase kommt nach A. STEPANOW und A. KUSIN<sup>5</sup> auch in grünen Blättern, z. B. in Lattich- oder Futterrübenblättern, in größerer Konzentration vor.

Carboligatische Reaktion mit Benzaldehyd. Nach NEUBERG und HIRSCH<sup>4</sup> werden zu einem Ansatz von 600 g Saccharose und 600 g obergäriger Hefe in 15 Litern Wasser nach dem Angären sehr allmählich 60 ccm frisch destillierten benzoessäurefreien Benzaldehydes zugefügt. Das Gemisch, das bei Zimmertemperatur digeriert wird, weist oft schon am nächsten Tage nur noch spurenhafte Geruch nach Benzaldehyd auf. Es bleibt weiter bis zum völligen Verschwinden des Benzaldehydgeruches stehen.

Zur Isolierung des neuen Körpers wird das filtrierte Gärgut 3—4mal mit Äther extrahiert, die vereinigten ätherischen Auszüge getrocknet und vom Äther auf dem Wasserbade

<sup>1</sup> C. NEUBERG u. E. REINFURTH: Biochem. Zeitschr. 1918, **92**, 234.

<sup>2</sup> C. NEUBERG u. E. REINFURTH: Biochem. Zeitschr. 1920, **106**, 281.

<sup>3</sup> C. NEUBERG u. J. HIRSCH: Biochem. Zeitschr. 1919, **96**, 175; 1919, **100**, 304; 1920, **105**, 307.

<sup>4</sup> C. NEUBERG u. J. HIRSCH: Biochem. Zeitschr. 1921, **115**, 282. — C. NEUBERG u. E. SIMON: Biochem. Zeitschr. 1925, **156**, 374.

<sup>5</sup> A. STEPANOW u. A. KUSIN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1931, **64**, 1345.

befreit. Zur Reinigung des erhaltenen Rohöles wird es einer fraktionierten Vakuumdestillation bei 16 mm unterworfen und das Carbinol aus dem Destillat als Phenylhydrazon oder als p-Nitrophenylosazon abgeschieden.

Carboligatische Synthese bei der Vergärung von Brenztraubensäure. Der bei der Brenztraubensäurespaltung als Endprodukt auftretende Acetaldehyd wird nach HIRSCH<sup>1</sup> zum Teil als Methylacetylcarbinol kondensiert. Eine genaue Bilanz der auf- und abbauenden Vorgänge bei der Brenztraubensäuregärung wurde von C. NEUBERG und A. v. MAY<sup>2</sup> aufgestellt. Die Ermittlung des Ketonalkohols wird als p-Nitrophenylosazon vorgenommen.

Aus einem Ansatz von 13,2 g Brenztraubensäure in 1500 ccm Wasser mit 100 g frischer Unterhefe wurden in einem Beispiel folgende Werte erhalten:

| Vergorene                   | Gefunden    |             |              |          |
|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|----------|
|                             | Kohlensäure | Acetaldehyd | Ketonalkohol | Zusammen |
| Brenztraubensäure<br>9,64 g | 2,86 g      | 2,86 g      | 2,07 g       | 9,75 g   |

Zur Bestimmung der Carboligasewirkung vgl. auch A. STEPANOW und A. KUSIN<sup>3</sup>.

## B. Biologische Oxydation.

### 1. Glykolyse und Atmung.

Unter Glykolyse versteht man den gesamten mehrphasigen Prozeß in der Zelle, der die Umlagerung der Hexosen, die Spaltung zur C<sub>3</sub>-Stufe und die Hydratisierung zur faßbaren Milchsäure umfaßt. Als Bestimmungsmethoden der Glykolyse kommen in Betracht: 1. die Bestimmung der gebildeten Milchsäure, die sowohl titrimetrisch als auch gasvolumetrisch ausgeführt werden kann; 2. die Bestimmung des restierenden Zuckers.

Unter Atmung versteht man die Reaktion lebenden Gewebes, bei der Sauerstoff verbraucht, Kohlensäure gebildet wird. Die Atmung wird gasvolumetrisch gemessen.

#### α) Bestimmung der Milchsäure nach FÜRTH-CHARNAS.

Nach diesem Verfahren wird die Milchsäure in schwefelsaurer Lösung mit Permanganat zu Acetaldehyd oxydiert, der Acetaldehyd überdestilliert und in einer abgemessenen Kaliumbisulfatlösung aufgenommen, die mit Jodlösung zurücktitriert wird. Die dabei störenden Stoffe, vor allem Eiweiß, Kohlenhydrate und andere organische Säuren, müssen vor der Milchsäurebestimmung vollkommen entfernt werden.

Enteiweißung und Entzuckerung. Die Enteiweißung des biologischen Ausgangsmaterials (z. B. Muskulatur) wird nach EMBDEN<sup>4</sup> durch Fällung nach SCHENK mit Salzsäure und Quecksilberchlorid erreicht. Die Entzuckerung geschieht nach MEYERHOF<sup>5</sup> und HIRSCH-KAUFFMANN<sup>6</sup> durch Fällung in calciumoxydalkalischer Lösung mit Kupfersulfat.

Erforderliche Lösungen.

1. 2%ige reinste Salzsäure,
2. 5%ige Quecksilberchloridlösung,
3. n-Schwefelsäure,
4. 10%ige Natriumwolframatlösung,
5. 10%ige Kupfersulfatlösung (CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O),
6. Aufschwemmung von 100 g Calciumoxyd (z. Anal.) in 1 Liter.

<sup>1</sup> J. HIRSCH: Biochem. Zeitschr. 1922, **131**, 178.

<sup>2</sup> C. NEUBERG u. A. v. MAY: Biochem. Zeitschr. 1923, **140**, 299.

<sup>3</sup> A. STEPANOW u. A. KUSIN: Biochem. Zeitschr. 1922, **131**, 178.

<sup>4</sup> G. EMBDEN u. F. KRAUS: Biochem. Zeitschr. 1912, **45**, 1. — G. EMBDEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, **143**, 297.

<sup>5</sup> O. MEYERHOF: Arch. ges. Physiol. 1924, **204**, 297; Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **141**, 316. — O. MEYERHOF u. K. LOHMANN: Biochem. Zeitschr. 1926, **168**, 128.

<sup>6</sup> H. HIRSCH-KAUFFMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **140**, 25.

Die praktische Ausführung der Milchsäurebestimmung gestaltet sich nach MEYERHOF folgendermaßen: Die Muskel bzw. Organe werden unter Vermeidung jeder unnötigen Verletzung und Reizung sorgfältig präpariert, sofort in ein in Eis stehendes Wägegglas gebracht, nach der Präparation auf einer analytischen Schnellwaage auf einige Milligramm genau gewogen und dann in einem gekühlten Mörser mit einer gemessenen Menge eiskalter 2%iger Salzsäure durch schnelles und kräftiges Zerdrücken mit dem Pistill abgetötet. Das geronnene Gewebe wird dann noch mit einer Schere fein zerkleinert. Bei der Verarbeitung von Froschmuskeln zur Bestimmung des Ruhe-Milchsäuregehaltes werden die Frösche zunächst  $\frac{1}{2}$  Stunde in Eis gehalten. Zur Tötung wird die Wirbelsäule dicht oberhalb des Beckens mit der Schere durchschnitten, um beim Ausbohren des Rückenmarks Tötungsstreckkrämpfe zu vermeiden. Die Hinterschenkel werden auf einem auf Eis stehenden Teller mit gekühlten Instrumenten abgehäutet, die ganzen Hinterschenkel schnell gewogen und auf einen ebenfalls auf Eis stehenden Teller abpräpariert. Nicht sofort verarbeitete Schenkel bewahrt man in einem gekühlten Gefäße auf. Die präparierten Muskel werden am besten von einem Gehilfen, nach dem Einbringen in eisgekühlte 2%ige Salzsäure sofort zerdrückt und mit der Schere fein zerschnitten. Der abpräparierte Schenkel wird dann zurückgewogen. Bei kleinen Muskelmengen (unter 5 g) werden 10 cm, bei größeren 15—25 cm Salzsäure verwendet, zur Enteiweißung (nach dem Zerschneiden) dieselbe Menge 5%iger Quecksilberchloridlösung zugefügt und bei größeren Muskelmengen noch dieselbe Menge Wasser gegeben.

Die Aufschwemmung wird im Mörser fein verrührt, und dann, ohne nachzuwaschen, möglichst quantitativ in eine kleine, verschließbare Pulverflasche gebracht. Den Rand des Ausgusses vom Mörser fettet man zweckmäßig ganz dünn mit Vaseline ein. Nach etwa 15stündigem Stehen unter gelegentlichem Umschwenken wird durch ein trockenes Filter filtriert, das klare Filtrat mit gasförmigem Schwefelwasserstoff entquecksilbert, das Quecksilbersulfid abfiltriert und die Flüssigkeit etwa 20—30 Minuten in einem mit Wasserdampf gesättigten Luftstrom durchlüftet, in Meßzylinder umgefüllt und die Hauptmenge mit Pipetten entnommen. Diese abgemessene Hauptmenge wird zur Entzuckerung mit einer mit der Pipette abgemessenen Kupfersulfatlösung und danach mit einer abgemessenen Menge der Calciumhydroxydaufschlammung versetzt. Unter Berücksichtigung der Acidität des durchlüfteten Filtrats werden auf 15 cm entnommener Flüssigkeit 5 cm der vorgeschriebenen Calciumhydroxyd- und 3 cm der Kupfersulfatlösung hinzugegeben. Innerhalb einer  $\frac{1}{2}$  Stunde schlägt bei wiederholtem Umschwenken die Färbung von grünlich nach blau um. Die Flüssigkeit, die stets stark alkalisch sein muß, wird nach dieser Zeit filtriert — gegebenenfalls nach vorhergehendem Zentrifugieren —, und von dem wasserklaren, farblosen oder schwach blau gefärbten Filtrat ein aliquoter Teil mit der Pipette entnommen und zur Milchsäurebestimmung gebracht. Man überzeugt sich von der Kohlenhydratfreiheit des Filtrates an einigen Tropfen durch den negativen Ausfall der Zuckerreaktion nach MOLISCH mit alkoholischer  $\alpha$ -Naphthollösung und konz. Schwefelsäure.

EMBDEN und seine Mitarbeiter unterbrechen zur Bestimmung des Ruhe-Milchsäuregehaltes die Glykolyse durch Gefrieren der Organe in flüssiger Luft. HIRSCH-KAUFFMANN gibt z. B. folgende Vorschrift: Die sorgfältig präparierten Muskel werden sofort in flüssige Luft geworfen und in einer Porzellanreischale mit einem Pistill in flüssiger Luft zerkleinert. Während der Zerkleinerung werden die Muskel in beste Verbandgaze eingehüllt. Das gewonnene, meist ziemlich grobkörnige Muskelepulver wird in ein Gläschen geworfen, das mit dem Doppelten des Muskelgewichtes entsprechenden Volumen 4% natriumchlorid-gesättigter Salzsäure gefüllt und vor dem Versuche unter Schließdeckelverschluß analytisch gewogen worden ist. Vor dem Einbringen des Muskelepulvers wird die Flüssigkeit durch etwas flüssige Luft stark gekühlt. Alle Teile der zerkleinerten Muskulatur werden durch vorsichtige Bewegung des Gefäßes mit der Säure in Berührung gebracht, wobei die Muskulatur allmählich auftaut. Das Gefäß wird sobald wie möglich mit seinem Schließdeckel verschlossen, in den Wägeraum gestellt und nachdem es dessen Temperatur angenommen hat, gewogen, wodurch die verwendete Muskelmenge ermittelt wird. Dann wird die Enteiweißung durch Zusatz von 20 cm Quecksilberchloridlösung zu Ende geführt. Hieran schließt sich dann die oben geschilderte Entzuckerung.

Die Enteiweißung der Flüssigkeit nimmt man in der Weise vor, daß z. B. 20 cm Blut in 20 cm 4%ige Salzsäure eingegossen werden, bis das Blut lackfarbig geworden ist; hierauf fügt man 40 cm 5%ige Quecksilberchloridlösung hinzu. Ebenso verfährt man bei Hefepreßsäften, Muskelpreßsäften oder Muskelextrakten.

In vielen Fällen führt die Enteiweißung nach FOLIN und WU<sup>1</sup> schneller zum Ziele. Man verwendet z. B. für 1 cm Blut, Plasma, Serum usw. je 5 cm 10%ige Natriumwolframatlösung und 1 N.-Schwefelsäure. Die geringen Mengen Wolframsäure, die in Lösung bleiben, stören die Milchsäurebestimmung nicht. Dieses Verfahren kann für Organe nicht verwertet werden, da auch nach tagelangem Stehen kein vollständiger Diffusionsausgleich zwischen Lösung und Muskelgewebe eintritt.

<sup>1</sup> O. FOLIN u. H. WU: Journ. Biol. Chem. 1919, 38, 81.

## Überführung der Milchsäure in Acetaldehyd.

Erforderliche Lösungen:

1. 5%ige Schwefelsäure.
2. 0,1 n-Permanganatlösung; hieraus durch Verdünnen 0,002 n-Permanganatlösung.
3. 0,1 n-Kaliumbisulfatlösung ( $\text{KHSO}_3$  meta).
4. 0,1 n-Jodlösung; hieraus durch Verdünnen 0,010 oder 0,005 n-Jodlösung.
5. 1%ige Stärkelösung.

Die Apparatur besteht nach MEYERHOF und K. LOHMANN<sup>1</sup> aus einem 100 ccm KJELDAHL-Kolben aus Jenaer Glas, der mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen ist, durch dessen eine Bohrung ein kleiner Tropftrichter mit Capillarrohr gesteckt ist (nach EMBDEN und LEHNARTZ<sup>2</sup> verwendet man zu diesem Zwecke ein spitz ausgezogenes und umgebogenes Glasrohr, das an der Biegungsstelle einen Sporn aus massivem Glas trägt), durch die andere ein doppelt gebogenes Glasrohr, das den Kolben mit einem kleinen LIEBIGSchen Kühler verbindet. Das Ende des Kühlrohres ist mit einem 20—25 cm langen Glasrohr durch eine Gummiverbindung beweglich verbunden, das bis auf den Boden einer 250 ccm fassenden LIEBIGSchen Vorlage reicht. Der bei 30 ccm Inhalt mit einer Marke versehene KJELDAHL-Kolben wird in einen BABO-Trichter gestellt. Der größte Wert ist auf ein gleichmäßiges Zutropfen der Permanganatlösung zu legen.

Ausführung der Bestimmung. Von der entzuckerten alkalischen Flüssigkeit wird ein mit der Pipette genau abgemessener aliquoter Teil, der 0,5—2 mg Milchsäure enthalten soll, in den KJELDAHL-Kolben gebracht, mit Schwefelsäure neutralisiert, dann mit 1,5 ccm der 5%igen Schwefelsäure angesäuert und auf 30 ccm aufgefüllt. Die Gesamtsäure-Konzentration beträgt 0,25%. Zur Erzielung gleichmäßigen Siedens wird eine Messerspitze Talkum zugesetzt. Dann bringt man in die Vorlage 2 ccm der 0,1 n-Bisulfatlösung, verdünnt mit doppelt destilliertem Wasser auf 30—35 ccm und verbindet dann die LIEBIGSche Vorlage so mit dem Kühlrohr, daß die ausgezogene Spitze nicht in die Bisulfatlösung eintaucht. Darauf füllt man die Capillare des Tropftrichters mit doppelt destilliertem Wasser. Während des Anheizens füllt man den Tropftrichter mit der Permanganatlösung. Bei 0,5—2 mg zu erwartender Milchsäure benutzt man ungefähr 0,002 n-Lösung. Sobald der Dampf der siedenden Flüssigkeit die Luft aus dem Kolben, dem Glasrohr und dem erweiterten oberen Teil des Kühlrohres vertrieben hat, wird die Vorlage durch den Gummistopfen luftdicht mit dem Kühlrohr verbunden. Die Spitze des Kühlrohres muß nun in die Bisulfatlösung eintauchen. Dann öffnet man den Glashahn des Tropftrichters und läßt die Permanganatlösung tropfenweise zufließen. Die Tropfgeschwindigkeit beträgt etwa 0,8 ccm Flüssigkeit je Minute. In demselben Tempo, wie das Zutropfen erfolgt, soll auch die Flüssigkeit im KJELDAHL-Kolben während des ganzen Versuches unverändert bleiben. Jeder Tropfen Permanganatlösung soll entfärbt werden; die Flüssigkeit darf nie rosa gefärbt sein. Die Oxydation von 2 mg dauert etwa 30 Minuten bis 1 Stunde. Das Ende der Oxydation gibt sich an einer Braunfärbung der Flüssigkeit zu erkennen. Von diesem Punkte an erhitzt man noch in derselben Weise unter beständigem Zutropfen von Permanganat 8—10 Minuten. Die Lösung der Vorlage wird nach 5—10 Minuten titriert.

Hierzu gibt man 1 ccm der Stärkelösung und beseitigt mit einer etwa 0,05 n-Jodlösung den größten Teil des überschüssigen Bisulfits und stellt mit der 0,010- oder 0,005 n-Jodlösung genau auf das erste Auftreten der Blaufärbung ein. Dann zersetzt man die Aldehyd-Bisulfidverbindung durch Zugabe von etwas festem Natriumbicarbonat (0,5—1 g), so daß die Lösung lackmusalkalisch wird und titriert von neuem bis zur Blaufärbung. Die jetzt verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter dient zur Berechnung.

Beispiel<sup>3</sup>. Es soll der Ruhe-Milchsäuregehalt in 7,50 g Froschmuskel bestimmt werden. Die Muskel sind mit 15,0 ccm 2%iger Salzsäure und 15,0 ccm Quecksilberchloridlösung versetzt. Das Gesamtvolumen ist jetzt 36 ccm. Nach der Enteiweißung wurden 25,0 ccm des durchlüfteten Filtrates zur Entzuckerung mit 8,0 ccm der Calciumhydroxydaufschwemmung und mit 5,0 ccm der Kupfersulfatlösung versetzt. Die Flüssigkeit ist also von 25 ccm auf 38,0 ccm verdünnt. Von dem Filtrat der Kupferkalkfällung wurden 27,0 ccm zur Milchsäurebestimmung verwendet.

Vorgelegt wurden 10 ccm 0,01 n-Bisulfatlösung und nach dem Zusatz von Bicarbonat 3,45 ccm 0,005 n-Jodlösung verbraucht. Da 1,0 ccm dieser Jodlösung 0,225 mg Milchsäure entspricht, beträgt die gesamte in den 27,0 ccm bestimmte Menge 0,776 mg Milchsäure, die noch mit dem Verlustfaktor, durchschnittlich 1,03 zu multiplizieren ist, also

<sup>1</sup> O. MEYERHOF u. K. LOHMANN: Biochem. Zeitschr. 1926, 168, 128.

<sup>2</sup> G. EMBDEN: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 143, 301.

<sup>3</sup> Aus K. LOHMANN: Chemische Bestimmung der Glykolyse und der Resynthese der Kohlenhydrate, in „Methoden der Fermente“ C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN. 1929, S. 127.

= 0,799 mg. Der Verlustfaktor ist durch Kontrollbestimmungen mit reinem Zinklactat bei der Einübung der Methode zu ermitteln.

Die in 7,5 g Muskel vorhandene Menge Milchsäure ist also nach Maßgabe der zur Verwendung gelangten aliquoten Teile 1,62 mg.

### β) Messung der Glykolyse und Atmung im lebenden Gewebe nach der manometrischen Methode von WARBURG<sup>1</sup>.

Die Glykolyse wird durch eine volumetrische Kohlensäurebestimmung im BARCROFT-Manometer gemessen. Die Kohlensäure wird in äquimolekularen Mengen durch die entstehende Milchsäure aus Bicarbonat in Freiheit gesetzt. Die Methode mißt die bei konstantem Volumen und konstanter Temperatur auftretende Veränderung des Gasdruckes, aus der die entstandene Gasmenge berechnet werden kann.

Apparatur. Das von WARBURG benutzte Manometer ist ähnlich dem BARCROFTSchen Blutgas-Manometer konstruiert (Abb. 19). Es

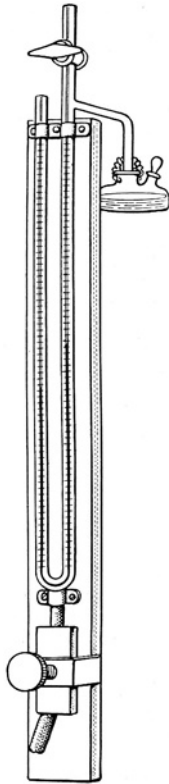


Abb. 19.  
Manometer nach  
WARBURG.

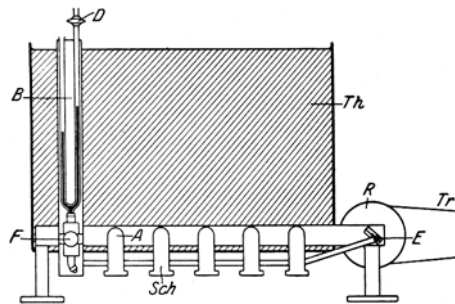


Abb. 20. Thermostat mit Schüttelvorrichtung.

besteht aus einer U-förmigen Capillare, die mit einem unten verschlossenen Gummischlauch kommuniziert. Der Durchmesser der Capillare beträgt 0,8—1,2 mm. Durch die Schraube *S* läßt sich die Sperrflüssigkeit verschieben und das Volumen des Versuchsraumes konstant halten. Als Sperrflüssigkeit dient die BRODIESCHE Flüssigkeit, die aus einer Lösung von 23 g Natriumchlorid und 5 g Natrium choleinicum (MERCCK) in 500 ccm Wasser und einigen Tropfen alkoholischer Thymollösung besteht. Eine Säule von 10000 mm dieser Flüssigkeit ist bei Zimmertemperatur gleich dem Normaldruck von 760 mm Quecksilber. Durch den Hahn *H* kann das Versuchsgefäß jederzeit mit der äußeren Atmosphäre verbunden werden. Mit Hilfe einer Messingtasche *M* wird das Manometer in die Schüttelvorrichtung eingesetzt. Die Reaktion wird in sog. Atmungströgen vorgenommen (Abb. 21—23), die durch einen Helmschliff mit dem Manometer verbunden sind.

Den für manometrische Messungen erforderlichen Wasserthermostaten mit Schüttelvorrichtung zeigt Abb. 20.

Eichung der Gefäße. Die Berechnung des Gaswechsels erfordert die Kenntnis des Volumens *v* des Versuchsgefäßes einschließlich der Manometercapillare bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit. Der Eichung liegt folgendes Prinzip zugrunde. Komprimiert man ein unbekanntes Volumen *v*<sub>1</sub>, das unter dem Atmosphärendruck *p* steht, auf ein kleineres, ebenfalls unbekanntes Volumen *v*<sub>0</sub>, so wächst der Druck um *h*<sub>1</sub> und es besteht die Beziehung

$$v_1 \cdot p = v_0 (p + h_1).$$

Verkleinert man das unbekannte Volumen *v*<sub>1</sub> um die bekannte Größe *a*, indem man eine

<sup>1</sup> O. WARBURG: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. Außerdem Biochem. Zeitschr. 1923, 142, 317; 1924, 152, 51; 1925, 164, 481.

<sup>2</sup> Die Abb. 19—23 sind aus O. WARBURG, Über den Stoffwechsel der Tumoren, Berlin 1926, entnommen.

bestimmte Menge Flüssigkeit einfüllt, und komprimiert wieder bis zum gleichen Punkt, so besteht die Beziehung:

$$(v_1 - a) \cdot p = (v_0 - a) \cdot (p + h_2).$$

$h_2$  ist größer als  $h_1$ , da  $v_0 - a$  kleiner ist als  $v_0$ . Aus Gleichung 1 und 2 ergibt sich das gesuchte Volumen  $v_0 = a \frac{h_2}{h_2 - h_1}$ .

Das Volumen des Gefäßes wird ermittelt durch eine abgemessene Menge Flüssigkeit und zwei Barometerablesungen. Man mißt  $h_1$  und  $h_2$  in völlig trockenen Gefäßen und füllt das Volumen  $a$  als Quecksilber ein, dessen Volumen man durch Auswiegen und unter Reduktion des spezifischen Gewichtes auf 0° errechnet. Um den Wert  $h_2$  zu bestimmen, füllt man soviel Quecksilber in das Gefäß ein, daß nur noch insgesamt etwa 1—1,5 ccm Gasraum übrig bleibt. Man verbindet den Trog mit seinem Manometer am Thermostaten, der auf Zimmertemperatur gebracht ist. Vor Beginn der Eichung und vor jeder neuen Einstellung senkt man bei offenem Hahn  $H$  die Sperrflüssigkeit unter die Nullmarke um die Höhe  $\Delta h$  und wartet, bis die Capillaren abgelaufen sind. Hierauf wird der Hahn geschlossen

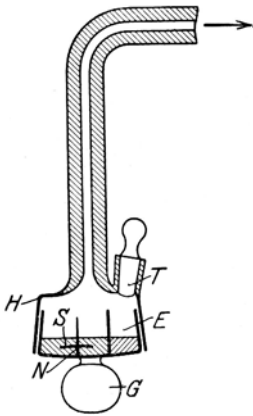


Abb. 21.

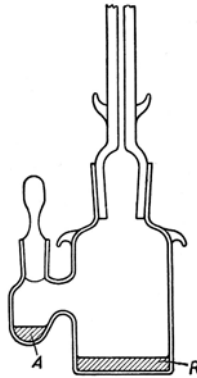


Abb. 22.

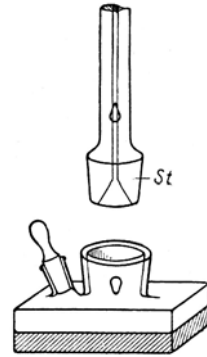


Abb. 23.

Abb. 21—23<sup>1</sup>. Atmungsströge nach WARBURG.

und die Sperrflüssigkeit in die Höhe gedrückt, bis der rechte Schenkel wieder auf der Nullmarke steht. Dabei steigt der linke Schenkel um die Höhe  $h_2$  über die Nullmarke hinaus. Zur Bestimmung von  $h_1$  wird man bei kleineren Gefäßen (unter 10 ccm) die Gefäße vollkommen entleeren, bei größeren läßt man ein neues, kleineres Volumen Quecksilber zurück. Hierauf wird die beschriebene Manipulation wiederholt und aus den gefundenen Werten für  $h_1$  und  $h_2$ , sowie aus dem Volumen  $a$  das gesuchte Gefäßvolumen berechnet.

Berechnung des Gaswechsels. Aus dem bei konstantem Volumen und konstanter Temperatur auftretenden Druck  $h$  wird die Menge des entstandenen oder verschwundenen Gases berechnet. Es sei

- $v_g$  das Volumen des Gasraumes in cmm,
- $v_f$  das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit in cmm,
- $T$  die absolute Versuchstemperatur,
- $\alpha$  der BUNSENSCHE Absorptionskoeffizient des Gases,
- $F_0$  der Normaldruck (760 mm Hg) in mm BRODIESCHER Flüssigkeit,
- $P$  der zufällige Anfangsdruck zu Beginn des Versuchs (etwa gleich dem Druck der äußeren Atmosphäre),
- $h$  die am Manometer während des Versuchs beobachtete Druckänderung in Millimetern BRODIESCHEN Flüssigkeit.

Die zu Beginn des Versuchs bei dem Anfangsdruck  $P$  und der Versuchstemperatur  $T$  im Gasraum vorhandene Gasmenge (in cmm) ist gleich  $v_g$ . Auf den Normaldruck (10000 mm) und die Normaltemperatur (273°) reduziert ist diese Gasmenge

$$\frac{P}{P_0} \frac{273}{T} \cdot v_g.$$

<sup>1</sup> Die Abb. 19—23 sind aus O. WARBURG, Über den Stoffwechsel der Tumoren, Berlin 1926, entnommen.

Die im Gasraum am Ende des Versuchs, wenn der Druck  $P$  um  $h$  zugenommen hat, also  $P + h$  beträgt, vorhandene Gasmenge ist in cmm

$$\frac{P + h}{P_0} \frac{273}{T} v_g.$$

Dann ist die Zunahme an Gas im Gasraum

$$\frac{P + h}{P_0} \frac{273}{T} v_g - \frac{P}{P_0} \frac{273}{T} v_g = \frac{h}{P_0} \frac{273}{T} v_g.$$

Gleichzeitig nimmt die Gasmenge, die in der Flüssigkeit gelöst ist, zu, und zwar je cmm Flüssigkeit und je mm BRODIEsche Flüssigkeit um  $\frac{\alpha}{P_0}$ , demnach für  $v_f$  cmm Flüssigkeit und  $h$  mm BRODIE um

$$\frac{h}{P_0} v_f \alpha.$$

Die Summen beider Zunahmen ist die insgesamt entstandene Gasmenge  $x$  (0°, 760 mm)

$$x = h \left[ \frac{v_g \frac{273}{T} + v_f \alpha}{P_0} \right].$$

Jeder Millimeter Druckänderung zeigt, unabhängig vom Gesamtdruck, das Entstehen bzw. das Verschwinden der gleichen Gasmenge an. Ist also  $h$  bekannt, so erhalten wir  $x$  durch Multiplikation mit dem in der Klammer stehenden Ausdruck, den WARBURG als „Gefäßkonstante“  $K$  bezeichnet. Je nach der chemischen Natur des entstehenden Gases, deren Partialdruckänderung  $h$  ausdrückt, ist die Gefäßkonstante verschieden ( $K_{O_2}$ ,  $K_{CO_2}$ ), weil die Absorptionskoeffizienten  $\alpha$  für die verschiedenen Gase verschieden sind.

Diese Berechnung ist jedoch nur gültig in den Fällen, in denen es sich um den Gaswechsel einer Gasart handelt, also z. B. bei der Glykolyse unter anaeroben Bedingungen. In den anderen Fällen, in denen gleichzeitig mehrere Gasarten entstehen oder verschwinden, wie z. B. bei der aeroben Glykolyse, ist die manometrische Messung komplizierter. Der entstehende Gasdruck ist abhängig von der entstehenden Atmungs-Kohlensäure, dem Atmungs-Sauerstoff, der verschwindet und der Kohlensäure, die aus dem Bicarbonat durch die Milchsäure ausgetrieben wird. Die beobachtete Druckänderung  $h$  ist gleich der Summe der Partialdruckänderungen der verschiedenen Gase, z. B. Sauerstoff und Kohlensäure.

$$h = h_{O_2} + h_{CO_2}$$

und die entwickelten bzw. verschwundenen Gasmengen sind

$$x_{O_2} = h_{O_2} \cdot k_{O_2}; \quad x_{CO_2} = h_{CO_2} \cdot k_{CO_2}.$$

Die für die Berechnung notwendigen Daten gewinnt WARBURG durch folgende Methode, die auf der Tatsache beruht, daß Kohlensäure in Wasser leichter löslich ist als Sauerstoff. Man füllt in zwei Gefäße von gleichem Gesamtvolumen gleiche Zellmengen, aber verschiedene Flüssigkeitsmengen ein.  $x_{O_2}$  und  $x_{CO_2}$  sind dann in beiden Gefäßen gleich, verschieden sind aber die Gefäßkonstanten, da  $v_g$  und  $v_f$  verschieden sind, und damit auch die Druckänderung in den beiden Gefäßen.

Unterscheidet man für die beiden Gefäße mit großem und kleinem Flüssigkeitsvolumen die Gefäßkonstanten und Druckänderungen durch große und kleine Buchstaben, so erhält man folgende sechs Gleichungen:

$$\begin{aligned} x_{O_2} &= h_{O_2} \cdot k_{O_2} & x_{O_2} &= H_{O_2} \cdot K_{O_2} \\ x_{CO_2} &= h_{CO_2} \cdot k_{CO_2} & x_{CO_2} &= H_{CO_2} \cdot K_{CO_2} \\ h &= h_{O_2} + h_{CO_2} & H &= H_{O_2} + H_{CO_2}. \end{aligned}$$

$h$  und  $H$  werden durch direkte Beobachtung gewonnen, die Gefäßkonstanten nach früher besprochener Weise berechnet. Dann ist:

$$x_{O_2} = \frac{h k_{CO_2} - H K_{CO_2}}{k_{O_2} - K_{O_2}}; \quad x_{CO_2} = \frac{h k_{O_2} - H K_{O_2}}{k_{CO_2} - K_{CO_2}}.$$

Für den Fall, daß das Verhältnis  $\frac{x_{O_2}}{x_{CO_2}}$  bekannt ist, kann die Messung und Berechnung

vereinfacht werden. Bezeichnet man das Verhältnis  $\frac{x_{O_2}}{x_{CO_2}}$  mit  $\gamma$ , so stehen für die Berechnung folgende vier Gleichungen zur Verfügung:

$$\begin{aligned} x_{O_2} &= h_{O_2} \cdot k_{O_2} & x_{CO_2} &= \gamma x_{O_2} \\ x_{CO_2} &= h_{CO_2} \cdot k_{CO_2} & h &= h_{O_2} + h_{CO_2}. \end{aligned}$$

Aufgelöst ergibt sich für

$$x_{O_2} = h \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} \cdot \gamma k_{O_2}} \quad x_{CO_2} = h \frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{\frac{k_{CO_2}}{\gamma} + k_{O_2}}$$

Für die Messung von  $X_{O_2}$  und  $X_{CO_2}$  ist also — falls  $\gamma$  bekannt ist — nur ein Gefäß erforderlich.

Herstellung der Ringerlösung. Für die RINGER-Lösungen werden dem Blutserum der jeweiligen Versuchstiere isotonische Stammlösungen bereitet. Bei Versuchen mit Rattenorganen benutzt man folgende Lösung:

1. 0,155 Mol. Natriumchloridlösung (9 g NaCl im Liter).
2. 0,155 Mol. Kaliumchloridlösung (11,5 g KCl im Liter).
3. 0,115 Mol. Calciumchloridlösung (mit Silbernitrat zu titrieren).
4. 0,155 Mol. Natriumbicarbonatlösung (13 g  $NaHCO_3$  im Liter).

Die Versuchslösung wird jedesmal frisch bereitet. Man mischt 96 Raumteile Natriumchlorid, 2 Raumteile Kaliumchlorid, und 20 Raumteile Bicarbonatlösung. Die Bicarbonatstammlösung reagiert im allgemeinen schwach alkalisch und erzeugt, der calciumchloridhaltigen Lösung zugesetzt, einen Niederschlag von Calciumcarbonat, der sich langsam beim Einleiten der kohlenensäurehaltigen Versuchsgasmischung wieder auflöst. Man vermeidet die Niederschlagsbildung, indem man die Bicarbonatstammlösung solange mit Kohlenensäure behandelt, bis die Phenolphthalein nicht mehr rötet.

Für glucosehaltige RINGER-Lösung wird 1 g Glucose in 10 ccm Wasser aufgelöst, die Lösung zum Sieden erhitzt und 2 ccm davon zu 98 ccm RINGER-Lösung hinzugegeben.

Kurz vor Benutzung wird die RINGER-Lösung mit dem Versuchsgasgemisch gesättigt.

Herstellung von Gewebsschnitten<sup>1</sup>. Die Herstellung von Gewebsschnitten geschieht mit einem mit RINGER-Lösung befeuchteten freihändig geführten Rasiermesser. Das zu schneidende Organ liegt dabei auf Filtrierpapier und ist an der das Papier berührenden Fläche mit der Versuchslösung befeuchtet. Die Schnitte werden so schnell wie möglich nach dem Töten des Versuchstiers angefertigt. Es wird immer eine Reihe von Schnitten hergestellt; sie werden in eine Glasschale mit RINGER-Lösung gelegt, mit der Schere zu ungefähr rechteckigen Scheiben zurechtgeschnitten und im durchfallenden Licht verglichen. Man wählt zum Versuch die dünnsten und gleichmäßigsten Schnitte; sie müssen dünner als 0,5 mm sein. Will man die Dicke der Schnitte bestimmen, so bringt man sie in eine Glasschale mit möglichst planparallelem Boden, die etwas RINGER-Lösung enthält, legt unter die Schale Millimeterpapier und stellt fest, wieviele Millimeterquadrate der Schnitt bedeckt. So erhält man die Fläche des Schnittes. Das Trockengewicht, multipliziert mit 5, ergibt mit hinreichender Genauigkeit das Frischgewicht und Volumen. Mit der Fläche und dem Volumen der Schnitte ist ihre mittlere Dicke gegeben als das Verhältnis Volumen: Fläche.

Der Gewebsschnitt wird zunächst in einer größeren Menge der Versuchslösung vorbadet und dann in das mit der Versuchslösung beschickte Gefäß hineingebracht.

Vorbereitung der Manometer und Gefäße für den Versuch<sup>2</sup>. Die Schliffflächen des Troges werden gut eingefettet und gasdicht aufeinandergesetzt. Die Füllung des Gasometers. Der Glasstopfen für den Tubus des Troges wird gefettet und auf den Tubus des Gefäßes leicht aufgesetzt, so daß der Gasstrom, der bei  $H$  eintritt, leicht entweichen kann. Hat man die Versuchslösung bereits vorher mit dem Gasgemisch gesättigt, so genügt ein kräftiger Gasstrom etwa 15 Sekunden lang, um die Luft aus dem Gefäß zu vertreiben. Ist die Lösung vorher nicht mit Gas gesättigt, so läßt man den Gasstrom einige Minuten lang durchströmen und bewegt währenddessen die Flüssigkeit möglichst stark. Zur Unterbrechung der Gaszufuhr verschließt man zuerst das Ventil an der Gasbombe bzw. am Gasometer; sofort danach drückt man den Stopfen in den Tubus fest ein und verschließt den Hahn  $H$ .

Jede Versuchsreihe enthält neben den Trögen, die das zu untersuchende Gewebe enthalten, ein Gefäß mit der gleichen Flüssigkeitsmenge und -art und dem gleichen Gasraum wie die übrigen Gefäße jedoch ohne lebendes Material. Die Druckänderungen, die in diesem Gefäß auftreten, sind durch Schwankungen des äußeren Atmosphärendruckes und der Thermostatentemperatur bedingt. Um den Stoffwechsel des Gewebes zu erhalten, ist die in dem gewebefreien Gefäß, dem Thermobarometer, gemessene Druckänderung von den in den gewebehaltigen Gefäßen gemessenen Druckänderungen zu subtrahieren.

Sind die für den Versuch bestimmten Manometer in der beschriebenen Weise vorbereitet, so werden sie in die Schüttelvorrichtung des Thermostaten eingesetzt. Dabei entsteht in den Gefäßen ein starker Überdruck. Um ihn auszugleichen, öffnet man den Hahn durch schnelles Umdrehen um  $180^\circ$ . Die Stopfen werden nochmals fest eingedreht; hierauf wird 15 Minuten lang bis zum Temperatureausgleich geschüttelt. Die Schüttelgeschwindigkeit

<sup>1</sup> O. WARBURG: Biochem. Zeitschr. 1923, 142, 323.

<sup>2</sup> S. MINAMI: Biochem. Zeitschr. 1923, 142, 334; ferner O. WARBURG (a. a. O.).



muß so groß sein, daß jederzeit Absorptionsgleichgewicht zwischen Gasphase und Flüssigkeitsphase besteht; eine Vermehrung der Schüttelgeschwindigkeit hat dann keinen Einfluß mehr auf die Ausschläge. Gewöhnlich wählt man eine Schüttelgeschwindigkeit von 80—120 Schwingungen je Minute.

Vor der Ablesung verschiebt man die Sperrflüssigkeit einige Millimeter über die Nullmarke hinaus, damit die Manometercapillaren benetzt werden. Dann unterbricht man das Schütteln, stellt den Meniscus im rechten Schenkel auf die Nullmarke und liest den Stand links ab. Die Ablesung sämtlicher Manometer des Versuchs erfolgt so schnell wie möglich nacheinander. Sogleich nach Beendigung der Ablesung wird das Schütteln fortgesetzt. Die weiteren Ablesungen folgen je nach Größe des Ausschlages nach 10 oder 20 Minuten.

Die Gewebeschnitte werden nach Beendigung des Versuchs mit wenig destilliertem Wasser abgespült und in einem Wägegläschen nach dem Trocknen bei 100° auf einer Mikrowaage gewogen.

Messung der Atmung. Bei der einfachsten Anordnung zur Messung der Atmung von Gewebeschnitten in RINGER-Lösung enthält der Trog einen Einsatz mit 5%iger Kalilauge (Abb. 21). Die Kalilauge absorbiert die entstehende Kohlensäure und die am Manometer abgelesene Druckänderung ist allein durch das Verschwinden des Sauerstoffs verursacht.

In den Hauptraum von Gefäß I gibt man 0,5 ccm RINGER-Lösung, in den Einsatz 0,1 ccm 5%ige Kalilauge. Dann befestigt man den Gewebeschnitt so auf der Glasnadel, daß er vollständig in die RINGER-Lösung eintaucht. Gefäß 0 enthält 0,5 ccm RINGER-Lösung und dient als Thermobarometer. Der Gasraum beider Gefäße wird mit Sauerstoff gefüllt. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung

$$x_{O_2} = h_{O_2} \cdot K_{O_2}.$$

Der Stoffwechsel wird auf das Gewebetrockengewicht und die Zeiteinheit bezogen. Als „Atmungsgröße“ wird der Quotient ( $Q_{O_2}$ )  $\frac{\text{ccm verbrauchter Sauerstoff}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}}$  bezeichnet.

Verbrauchen also  $m$  mg Gewebe in  $t$  Stunden  $x_{O_2}$  ccm Sauerstoff, so ist  $Q_{O_2} = \frac{x_{O_2}}{m \cdot t}$ . Die Atmungsgröße  $Q_{O_2}$  ist negativ.

Kohlensäuredruck und Wasserstoffionenkonzentration entsprechen bei dieser Anordnung nicht ganz den physiologischen Bedingungen; die Abweichung von den Bedingungen der lebenden Zellen auf die Atmung ist nach WARBURG in vielen Fällen ohne erheblichen Einfluß.

In einer zweiten Methode zur Messung der Atmung, die das auf S. 806 behandelte Prinzip zur Grundlage hat, wird den physiologischen Bedingungen besser entsprochen: Man benutzt drei Gefäße von ungefähr gleichem Inhalt und von der Form der Abb. 23. Der Stopfen der Gefäße ist konisch ausgebohrt. Der Rauminhalt eines Gefäßes einschließlich der Manometercapillare bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit beträgt etwa 13 ccm. Gefäß 0 enthält einige ccm RINGER-Lösung; es dient als Thermobarometer. In Gefäß I werden 3 ccm, in Gefäß II 7 oder 8 ccm glucosehaltiger RINGER-Lösung eingefüllt; sie wird mit einem Gemisch von 5 Vol.-% Kohlensäure in Sauerstoff gesättigt. Dann kommen in beide Gefäße zwei möglichst gleiche Teile desselben Schnittes oder zwei aufeinanderfolgende Schnitte, die gleichartig sein müssen, d. h. je Gewichtseinheit die gleiche Menge Sauerstoff verbrauchen.

Die Luft wird aus dem Gasraum durch Sauerstoff mit 5 Vol.-% Kohlensäure verdrängt. Es ist notwendig, die Bohrung bei Gefäß II vor dem Versuch mit hochschmelzendem Paraffin zu überziehen, um ein Überkriechen der Flüssigkeit in die Manometercapillare zu verhindern. Man erwärmt hierzu vorsichtig den Stopfen, taucht ihn in das geschmolzene Paraffin ein und verhindert während des Erkaltes durch Hochdrehen und Hin- und Herbewegen der Sperrflüssigkeit mittels der Schraube — bei geschlossenem Hahn — daß das Paraffin das Lumen der Manometercapillare verschließt. Von den Schiffsflächen entfernt man das Paraffin nach völligem Erkalten durch Filtrierpapier.

In den Formeln zur Berechnung des Gaswechsels

$$x_{O_2} = \frac{h K_{CO_2} - H K_{CO_2}}{\frac{h}{k_{O_2}} - \frac{H}{K_{O_2}}} \quad \text{und} \quad x_{CO_2} = \frac{h k_{O_2} - H K_{O_2}}{\frac{h}{k_{CO_2}} - \frac{H}{K_{CO_2}}}$$

sind  $h$  und  $H$  die in gleichen Zeiten durch gleiche Schnittgewichte hervorgebrachten Druckänderungen. Die beobachteten Druckänderungen sind also auf gleiche Schnittgewichte zu beziehen. Hat  $a$  mg Gewebe in Gefäß I die Druckänderung  $h$  hervorgebracht und  $b$  mg Gewebe in Gefäß II die Druckänderung  $H'$ , so berechnet man  $H$  nach der Gleichung

$H = H' \cdot \frac{a}{b}$  und setzt  $h$  und  $H$  — die zu gleichen Zeiten durch gleiche Gewebegewichte erzeugten Drucke in die beiden Gleichungen ein. Aus dem erhaltenen Wert für  $x_{O_2}$  wird die Atmungsgröße berechnet.

### Messung der Glykolyse.

α) Glykolyse unter anaeroben Bedingungen. In zwei Tröge I und II, deren Volumen um nicht mehr als 10% differieren soll, bringt man je einen Gewebsschnitt. In dem Troge I befinden sich 0,5 ccm RINGER-Lösung, in dem Troge II 0,5 ccm einer RINGER-Lösung, der je Liter 2 g Glucose zugesetzt sind. Die Schnitte sind in einer größeren Menge Lösung vorgebadet, Schnitt I in einer zuckerfreien RINGER-Lösung, Schnitt II in einer zuckerhaltigen. Nachdem die Tröge mit dem Manometer verbunden sind, werden ihre Gasräume mit einer Mischung von 5 Vol.-% Kohlensäure und 95 Vol.-% Stickstoff gefüllt. Um vollständige Anoxybiose zu erhalten, wird das Gasgemisch auf dem Wege von der Bombe zur RINGER-Lösung durch ein glühendes mit metallischem Kupfer gefülltes Rohr geleitet. Hierauf werden Gewebsschnitte und Lösung durch Schütteln mit der Gasmischung in das Absorptionsgleichgewicht gebracht. Die Druckänderung im Troge I =  $H_1$  dient dazu, um den Nullpunkt für die in Troge II auftretenden Druckänderungen festzustellen. Die Druckänderung im Troge II =  $H_2$  ist außer durch dieselben Umstände wie im Troge I auf die Milchsäurebildung aus der Glucose der RINGER-Lösung zurückzuführen.

Die Kohlensäuremenge, die durch die Glykolyse ausgetrieben wird bei Druckänderungen von  $H_1$  bzw.  $H_2$  und den Gewebsschnitten vom Gewicht  $m_1$  bzw.  $m_2$  ist in cmm gleich

$$x_{CO_2} = \left( H_2 - H_1 \frac{m_2}{m_1} \right) K_{CO_2}^{II},$$

wo  $K_{CO_2}^{II}$  die Gefäßkonstante für  $CO_2$  des Troges II bedeutet. 1 cmm Kohlensäure ist 0,004 mg Milchsäure äquivalent.

Die Größe der Glykolyse wird ausgedrückt durch den Quotienten  $\frac{\text{mg gebildete Milchsäure}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}}$ . Als Gewicht des Gewebes wird das Trockengewicht gesetzt, das nach völligem Trocknen bei 100° resultiert.

β) Glykolyse unter aeroben Bedingungen. Das Verfahren zur Messung der aeroben Glykolyse ist dasselbe wie das auf S. 808 beschriebene Verfahren zur Messung der Atmung. Man erhält bei der Messung die Atmungsgröße ( $Q_{O_2}$ ) und die Gesamtsäurebildung ( $Q_s$ ), d. i. die neugebildete Kohlensäure und die durch die Glykolyse entstandene Milchsäure. Um aus der Gesamtsäurebildung die Milchsäurebildung zu berechnen, macht man die willkürliche Annahme, daß der respiratorische Quotient gleich 1 ist, daß also  $x_{CO_2} = -X_{O_2}$  ist; daraus folgt  $x_M = x_s + x_{O_2}$ . In allen denjenigen Fällen, in denen  $x_M$  groß ist gegen  $x_{CO_2}$ , bedingt diese Annahme keine großen Fehler. Ist dagegen die Glykolyse klein gegen die Atmung, so mißt man die Glykolyse nach E. NEGELEIN<sup>1</sup> in RINGER-Lösung durch Bicarbonatbestimmung.

Gewöhnlich wird man neben der aeroben Glykolyse gleichzeitig auch die anaerobe Glykolyse messen. Man verwendet dann vier Gefäße; I und II dienen zur Messung von  $x_{O_2}$  und  $x_s$ , III zur Messung von  $x_M$ , das Gefäß IV als Thermobarometer. Die aerobe Glykolyse ist im allgemeinen kleiner als die anaerobe Glykolyse. Die Atmung bringt einen Teil der Glykolyse zum Verschwinden. Das Verhältnis  $\frac{\text{anaerobe Glykolyse} - \text{aerobe Glykolyse}}{\text{Atmung}}$  nennt man den MEYERHOFschen Quotienten<sup>2</sup>.

Durch Bicarbonatbestimmung wird die Glykolyse von Gewebeschnitten nach E. NEGELEIN<sup>1</sup> in folgender Weise gemessen: Man benutzt vier Gefäße von der Form der Abb. 22. Gefäß 0 wird mit 1 ccm RINGER-Lösung beschickt und dient als Thermobarometer. Gefäß I wird im Hauptraum mit 1 ccm RINGER-Lösung beschickt, im Anhang mit 0,2 ccm 4%iger Citronensäure. Gefäße II und III werden im Hauptraum mit 1 ccm RINGER-Lösung und einem Gewebsschnitt beschickt, im Anhang mit 0,2 ccm 4%iger Citronensäure, der Gasraum der vier Gefäße enthält Sauerstoff mit 5 Vol.-% Kohlensäure. Die Gefäße werden im Thermostaten bei 37,5° 10 Minuten zwecks Temperatur- und Druckausgleich geschüttelt. Bei der Zeit  $t_0$  wird die Citronensäure aus den Anhängen der Gefäße I und II in den Hauptraum eingekippt, wobei die Kohlensäuremengen  $B_1$  und  $B_2$  im Gasraum erscheinen und manometrisch gemessen werden. Sind nun die Schnittgewichte

<sup>1</sup> E. NEGELEIN: Biochem. Zeitschr. 1925, 158, 127.

<sup>2</sup> O. MEYERHOF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1925, 58, 991. — O. WARBURG, K. POSENER u. E. NEGELEIN: Biochem. Zeitschr. 1924, 152, 309.

bekannt —  $m_2$  für Gefäß II und  $m_3$  für Gefäß III —, so kann die Bicarbonatkonzentration in Gefäß III zur Zeit  $t_0$  ( $B_3^0$ ) berechnet werden nach der Gleichung

$$B_3^0 = B_1 - \frac{m_3}{m_2} (B_1 - B_2).$$

Gefäß III wird eine passende Zeit — die je nach der zu erwartenden Größe der Glykolyse zu bemessen ist — weitergeschüttelt. Sodann, zur Zeit  $t'$ , wird die Citronensäure aus dem Anhang in den Hauptraum eingekippt. Die nach Druck- und Temperatenausgleich gemessene Kohlensäuremenge sei  $B_3$ . Dann ist der gesuchte Wert

$$x_M = B_3^0 - B_3.$$

In manchen Fällen ist es notwendig, Atmung wie Glykolyse nicht in RINGER-Lösung, die den Stoffwechsel mancher Zellen stört, zu messen, sondern in Serum. Vgl. dazu Arbeiten von NEGELEIN<sup>1</sup> und WARBURG<sup>2</sup>.

## 2. Dehydrasen.

Dehydrasen bzw. Oxydasen sind die Träger der biologischen Oxydation in der Zelle. Die Wirkung der Dehydrasen kann auf verschiedenen Wegen gemessen werden. Entweder man bestimmt den Verbrauch des Sauerstoffes gasvolumetrisch oder man mißt die verschwundenen bzw. die neuentstandenen Reaktionsprodukte. Es gibt aber noch eine andere Methode, die die eigentlich dehydrierende Wirkung dieser Fermente zu messen gestattet. Nach den Beobachtungen WIELANDS sind nämlich die Dehydrasen imstande, oxydable Substanzen auch ohne Sauerstoff zu oxydieren, wenn man nur dem System einen Wasserstoffacceptor, z. B. in Form von Chinon oder Methylenblau, zur Verfügung stellt; unter dem Einfluß von aktiviertem Wasserstoff gehen diese Körper in Hydrochinon bzw. in die farblose Leukobase des Methylenblau über.

Man kann also die enzymatisch hervorgerufene Wasserstoffaktivierung messen durch Verwendung von Indicatoren, welche mit dem aktivierten Wasserstoff reagieren. Unter diesen Wasserstoffindicatoren ist der am besten bekannte und gebräuchlichste das Methylenblau. Im folgenden wird die von THUNBERG<sup>3</sup> ausgearbeitete Methode beschrieben.

### a) Messung der Wasserstoffaktivierung nach THUNBERG.

**Apparatur.** Zur Ausführung der THUNBERGSchen Methode ist eine Reihe von Vakuumröhren (Abb. 24) nötig. Sie dienen zur Aufnahme des Reaktionsgemisches unter Ausschluß von Sauerstoff. Sauerstofffreiheit ist nötig, da Sauerstoff als Wasserstoffacceptor wirkt, wobei Wasser gebildet wird. Der aktive Wasserstoff würde sich dann zwischen dem Sauerstoff und dem Methylenblau verteilen.

Das THUNBERGSche Vakuumrohr ist ein etwa 10 cm fassendes Glasrohr aus gehärtetem Glas, das mit einem gut eingeschliffenen Glasstöpsel geschlossen werden kann. Der Glasstöpsel ist zwischen dem obersten und mittleren Drittel seiner Höhe mit einem Loch von 2—3 mm Durchmesser versehen. Am Rohr ist in entsprechender Höhe ein Seitenrohr angebracht, das durch Drehen des Glasstöpsels gesperrt werden kann. Dieses Seitenrohr wird durch einen Vakuumschlauch mit einer Vakuumpumpe verbunden. Für eine Versuchsreihe benötigt man 12—18 Rohre von gleicher Größe.

Zum Versuch werden die mit dem Reaktionsgemisch beschickten Röhren mittels einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und in diesem Zustand in einen Thermostaten mit Glaswänden gesenkt, der eine leichte Beobachtung der Entfärbung ermöglicht.

Zur Verwendung als Methylenblau kommt Methylenblaulorid (nicht das Zinkdoppelchlorid). Für die Versuche ist es zweckmäßig, Lösungen von 1 : 500 bis 1 : 10000

<sup>1</sup> E. NEGELEIN: Biochem. Zeitschr. 1925, 164, 481.

<sup>2</sup> O. WARBURG: Biochem. Zeitschr. 1924, 152, 309.

<sup>3</sup> T. THUNBERG: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) 35, 163; siehe auch T. THUNBERG in „Methodik der Fermente“, herausgegeben von C. OPPENHEIMER u. L. PINOUSSEN, Leipzig 1929, S. 1118.

vorrätig zu halten. Die Lösungen sind im Dunkeln gut haltbar. Die Wasserstoffionenkonzentration wird je nach den gewünschten Versuchsbedingungen mit Phosphatpuffer eingestellt.

Als Wasserstoffdonatoren für die Dehydrasen wirken sehr viele Substanzen. Nach neueren Anschauungen ist die dehydrierende Wirkung auf die verschiedenen Substanzen nicht auf ein Enzym, sondern auf ein Gemenge verschiedener Dehydrasen zurückzuführen; eine sichere Unterscheidung der Dehydrasen ist indes bis heute nur in wenigen Fällen möglich. Als Donatorsubstanz für tierische Gewebe wirken z. B. Fleischmilchsäure und Bernsteinsäure. Man kann soviel von diesen Säuren in Form ihrer neutralen Kaliumsalze zusetzen, daß das Reaktionsgemisch z. B. 0,2—0,5% von ihnen enthält. Ausgezeichnete Donatorsubstanzen sind nach DEUTICKE<sup>1</sup> Hexosephosphorsäure und Adenosintriphosphorsäure.

**Ausführung der Bestimmung.** Zum Enzympräparat (z. B. 0,2 g Muskelbrei) kommt 1 ccm einer Mischung von gleichen Teilen Methylenblaulösung 1:500 und Phosphatpuffer ( $p_H = 7-8$ ) und die zur Untersuchung kommende Donatorsubstanz. Nachdem die Vakuumröhre mit dem Reaktionsgemisch versehen sind, werden die Glasstöpsel eingefettet und eingesetzt, während etwa 1—2 Minuten evakuiert und hierauf in den Thermostaten gesetzt. Diese Manipulationen haben sehr schnell und gleichmäßig zu erfolgen.

Abgelesen wird die Zeit von der Versenkung in das Wasserbad bis zum Eintritt vollständiger Entfärbung.

WIELAND und ROSENFELD<sup>2</sup> benutzen ein Vakuumrohr mit aufsetzbarer Mikrobürette; Donatorsubstanz und Methylenblaulösung kommen erst nach vollkommener Vertreibung des Sauerstoffs durch Evakuieren und Durchleiten von Stickstoff zur Enzymlösung. Eine schärfere Einhaltung der Versuchsbedingungen ist dadurch gewährleistet.

Durch Variieren der Methylenblaumenge kann man die ungefähre Entfärbungszeit willkürlich wählen, zweckmäßig beträgt sie etwa 30 Minuten. Unter den exakteren Bedingungen, die WIELAND und Mitarbeiter anwenden, sind kürzere Bestimmungszeiten möglich. Man nimmt den Mittelwert aus 5 bis 10 Proben.

### β) Bestimmung der Dehydrasewirkung durch Messung des Sauerstoffverbrauches.

**Bestimmung nach BATELLI und STERN<sup>3</sup>.** Das auf seinen Gehalt z. B. an Alkoholdehydrase zu untersuchende Gewebe wird in der Fleischmühle fein gemahlen, mit dem dreifachen Volumen Wasser versetzt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, in einen ERLENMEYER-Kolben gebracht und in Gegenwart von Alkohol und Sauerstoff bei 38—40° energisch geschüttelt. Man benutzt am besten einen in einem Wasserthermostaten untergebrachten Schüttelapparat. Die Reaktionsgefäße werden mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Der Stopfen ist mit zwei Glashähnen versehen, von denen der eine mit einem als Eudiometer dienenden Wassermanometer verbunden, der andere zum Eintragen verschiedener Stoffe in das Reaktionsgefäß bestimmt ist. Ein im oberen Teil des Reaktionsgefäßes angebrachter Kaliapparat dient zur Absorption der etwa entstandenen Kohlensäure.

Die die Gewebssuspensionen enthaltenden Reaktionsgefäße werden auf dem Schüttelapparat befestigt, in das Wasserbad versenkt und bis zum Ausgleich der Temperatur stehen gelassen. Man bringt hierauf in das eine Gefäß die nötige Menge des zu oxydierenden Alkohols (0,50 g Äthylalkohol für 100 g Gewebe), verbindet durch entsprechendes Einstellen des Dreiveghahnes das Reaktionsgefäß mit dem Eudiometer und setzt den Schüttelapparat in Bewegung. Der durch Oxydation des Alkohols bewirkte Sauerstoffverbrauch kann auf diese Weise eudiometrisch gemessen werden. Aus dem Unterschiede des Sauerstoffverbrauches in der mit Alkohol versetzten und dem alkoholfreien Gewebssuspension berechnet man den für die Alkoholoxydation verbrauchten Sauerstoff.

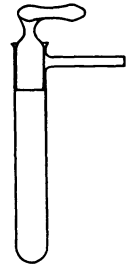


Abb. 24.  
THUNBERGSCHES  
Vakuummeter.

<sup>1</sup> H. J. DEUTICKE: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **192**, 193.

<sup>2</sup> H. WIELAND u. B. ROSENFELD: Ann. Chem. 1929, **477**, 32.

<sup>3</sup> F. BATELLI u. STERN: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden III, **444** (1910). Biochem. Zeitschr. 1910, **28**, 45; Erg. Physiol. 1912, **12**, 96.

Beispiel. Je 40 g Pferdeleberbrei werden in zwei Reaktionsgefäßen mit 120 ccm Wasser versetzt und Ammoniak in einer Gesamtkonzentration von 1 : 1500 hinzugesetzt. Nach Ausgleich der Temperatur wird in den einen Kolben 0,20 g Äthylalkohol eingebracht. Nach 1 Stunde mißt man den Sauerstoffverbrauch der beiden Reaktionsgemische. Man findet für die Kontrollprobe 25 ccm und für die mit Alkohol versetzte Probe 46 ccm. Die Steigerung des Sauerstoffverbrauches beträgt 21 ccm.

Daß diese Steigerung des Sauerstoffverbrauches durch die Oxydation des zugesetzten Alkohols bewirkt ist, geht aus dem Auftreten von Essigsäure und von geringen Mengen Acetaldehyd hervor, sowie aus der Verminderung des zugesetzten Alkohols.

Für genaue Messungen des Sauerstoffverbrauches benutzen WIELAND und Mitarbeiter<sup>1</sup> BARCROFT-WARBURG-Gefäße mit seitlich aufgeschliffenem Behälter, aus dem die Enzymlösung nach Einstellung des Temperaturgleichgewichts eingeschüttet werden kann.

### γ) Alkoholdehydrasen.

Eine typische Dehydrase ist die Alkoholdehydrase, die die Umwandlung des Äthylalkohols in Essigsäure bewirkt. Das Ferment kommt vor allem in Essigbakterien vor, in *Bacterium ascendens* und *pasteurianum*. Aber auch in tierischen Geweben findet es sich nach BATELLI und STERN<sup>2</sup>.

Die Umwandlung des Äthylalkohols erfolgt nach C. NEUBERG<sup>3</sup> über die Zwischenstufe des Acetaldehyds. Der Nachweis des Acetaldehyds als Zwischenstufe bei der Essigsäuregärung gelingt mit Hilfe des Abfangverfahrens mit Natriumsulfit. Der durch Dehydrierung gebildete Acetaldehyd wird nach NEUBERG<sup>4</sup> durch Dismutation zu Essigsäure und Äthylalkohol disproportioniert, wobei der zurückgebildete Äthylalkohol von neuem zu Acetaldehyd oxydiert wird. Nach WIELAND und BERTHO<sup>5</sup> stellt diese zweite Stufe nicht die Hauptreaktion dar, vielmehr wird der Acetaldehyd durch eine Aldehydrase weiter dehydriert zur Stufe der Essigsäure.

Alkoholdehydrasen mit spezifischer Einstellung kommen in anderen Bakterienarten vor. So z. B. vermögen nach VIRTANEN und BÄRLUND<sup>6</sup> *Bacterium xylinum*, *Acetobacter suboxydans* und *Bacterium Dioxyceticum* Glycerin in guter Ausbeute in Dioxyceton überführen.

### δ) Aldehydrasen.

Die bestuntersuchte Aldehydrase ist das SCHARDINGERSche Enzym der Milch. Rohe Kuhmilch besitzt, wie SCHARDINGER zuerst gefunden hat, die Fähigkeit, Methylenblau bei Gegenwart von Formaldehyd zu entfärben. Besonders im Rahm ist der Enzymgehalt sehr groß.

Darstellung eines gereinigten Trockenpräparates nach DIXON und THURLOW<sup>7</sup>. Die Milch wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und einige Minuten stehen gelassen. Dann filtriert man das abgeschiedene Caseinogen und Fett ab und trocknet soweit als möglich durch Pressen zwischen Filtrierpapier. Auf eine möglichst vollkommene Trocknung ist hierbei zu sehen. Man zerbricht dann die Masse und extrahiert sie gründlich mit kaltem Äther, wobei man den Vorgang durch häufiges Schütteln beschleunigt. Der Äther wird abgesaugt und die Substanz wieder zwischen Filtrierpapier abgepreßt, um soviel wie möglich Äther und Wasser zu entfernen; dann breitet man die Substanz aus und trocknet sie etwa 12 Stunden im Vakuumexsiccator. Danach wird wieder mit Äther extrahiert, im Vakuum gut getrocknet und in einem Mörser gepulvert. Das Präparat ist in Wasser löslich.

<sup>1</sup> H. WIELAND u. B. ROSENFELD: Ann. Chem. 1929, 477, 32. — H. WIELAND u. T. F. MACRAE: Ann. Chem. 1930, 483, 217.

<sup>2</sup> F. BATELLI u. L. STERN: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden III 444 (1910).

<sup>3</sup> C. NEUBERG u. F. F. NORD: Biochem. Zeitschr. 1919, 96, 158.

<sup>4</sup> C. NEUBERG u. F. WINDISCH: Biochem. Zeitschr. 1925, 166, 454.

<sup>5</sup> H. WIELAND u. BERTHO: Ann. Chem. 1928, 467, 95.

<sup>6</sup> A. I. VIRTANEN u. B. BÄRLUND: Biochem. Zeitschr. 1926, 169, 169.

<sup>7</sup> DIXON u. THURLOW: Biochem. Journ. 1924, 18, 971.

Darstellung eines Trockenpräparates nach WIELAND und ROSENFELD<sup>1</sup>. Frische Milch wird sehr lange und scharf zentrifugiert, wobei ein möglichst konzentrierter Rahm gewonnen wird, der abgehoben und in einer flachen Schale dünn ausgebreitet, über konz. Schwefelsäure und viel festem Ätzkali im Vakuumexsiccator getrocknet wird. Die butterschmalzähnliche Masse wird in einer Hülse im SOXHLET-Apparat mit reinstem absolutem Äther, hierauf mit niedrig siedendem Petroläther erschöpfend extrahiert. Das zurückbleibende trockene Pulver ist sehr wirksam und haltbar. In Wasser bzw. in 0,05 m Phosphatpuffer von  $p_H = 8,0$  löst es sich zu einer opalisierenden Flüssigkeit auf.

Durch Adsorption mit ganz wenig Tonerde C  $\gamma$  kann das Präparat weitgehend von Eiweiß befreit werden.

Die Aktivität solcher Präparate läßt sich nach WIELAND und MACRAE<sup>2</sup> auf mehr als das doppelte steigern, wenn man die wäßrige Lösung mit Acetatpuffer  $p_H = 4,5$  bei 37° fällt. Der so zu gewinnende Niederschlag ist von einem großen Teil der Begleitstoffe befreit.

Beispiel. 150 mg Enzympräparat aus Rahm werden in 12 ccm Wasser bei 37° gelöst und mit 3 ccm 0,25 m Acetatpuffer  $p_H = 4,5$  2 Minuten bei 37° geschüttelt. Die dabei entstehende Fällung wird abzentrifugiert, einmal mit 10 ccm Wasser, dem einige Tropfen der gleichen Pufferlösung hinzugefügt waren, gewaschen und hierauf erneut in der Zentrifuge abgeschieden. Der nicht getrocknete Niederschlag ist leicht löslich in 10 ccm 0,1 m Phosphatpuffer vom  $p_H = 8,0$ .

Das Maß für die Aldehydrase der Milch definieren WIELAND und ROSENFELD, wie folgt: Eine Salicylaldehydrase-Einheit ist diejenige Enzymmenge, die bei Gegenwart von 0,2 ccm 0,02 m Salicylaldehyd bei  $p_H = 8,0$  im Gesamtvolumen von 5,0 ccm 1 ccm 0,001 n-Methylenblau bei 37° in 5 Minuten entfärbt. Diese einfache Kennzeichnung der Enzymwirksamkeit ist auf den linearen Verlauf der Methylenblaureaktion und auf der Tatsache, daß das Produkt aus Entfärbungszeit und Menge wirksamen Enzyms konstant ist, gegründet.

Nach WIELAND und MACRAE kommt der Dehydrase der Milch auch Mutase-wirkung zu. Die CANNIZZAROSCHE Reaktion ist nach diesen Forschern eine Äußerung eines und desselben Enzymsystems, das die Dehydrierung der Aldehyde, sei es mit Methylenblau, sei es mit Sauerstoff beschleunigt. Der Aldehyd mit der Gruppe  $> C = O$  bietet sich dem aktivierten Wasserstoff seiner Hydrat-form als Acceptor dar.

Zu ähnlichen Schlüssen sind EULER und MYRBÄCK<sup>3</sup> in bezug auf die Hefemutase (vgl. S. 795) gekommen. Für pflanzliche Aldehydrasen bestreitet neuerdings D. MICHLIN und B. SEVERIN<sup>4</sup> die Identität von Aldehydrase und Mutase.

Man mißt die Mutasewirkung, wenn die Reinheit der Enzymlösung eine direkte alkalimetrische Titration gestattet, durch Titration der bei der Dis-mutation gebildeten Säure in der Reaktionslösung beispielsweise mit 0,05 n-Baryt-lauge gegen Phenolphthalein als Indicator.

WIELAND gibt folgendes Versuchsbeispiel. 5 ccm gereinigte Enzymlösung aus Milch werden in THUNBERG-Röhrchen mit aufsetzbarer Mikrobürette zusammen mit 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung gegeben und auf 37° gebracht. Nachdem evakuiert und wieder mit Stickstoff gefüllt ist, wird 1 ccm m-Acetaldehyd im lebhaften Stickstoffstrom zu-gefügt. Nun wird die Mikrobürette mit 0,05 n-Baryt-lauge eingesetzt und bis zur schwachen Rosafärbung titriert. Man braucht z. B. 0,22 ccm für eine geringe im Aldehyd enthaltene Menge von Essigsäure. In dem Maße wie die Färbung durch neugebildete Säure verschwindet, läßt man Barytwasser in Mengen von 0,05 ccm zutropfen.

In anderen Fällen, wo eine direkte Titration der Säure wegen der Puffer-wirkung der Enzymlösung nicht möglich ist, wird der nicht verbrauchte Aldehyd mit Wasserdampf übergetrieben und nach RIPPER bestimmt.

<sup>1</sup> H. WIELAND u. B. ROSENFELD: Ann. Chem. 1929, 477, 32.

<sup>2</sup> H. WIELAND u. F. MACRAE: Ann. Chem. 1930, 483, 217.

<sup>3</sup> H. v. EULER u. K. MYRBÄCK: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 165, 28.

<sup>4</sup> D. MICHLIN u. B. SEVERIN: Biochem. Zeitschr. 1931, 237, 339.

Die Bestimmung der Mutasewirkung in der Hefe siehe S. 795.

Darstellung der im Fleisch vorkommenden Dehydrasen nach THUNBERG<sup>1</sup>. Pferde- oder Ochsenfleisch wird sorgfältig von Fett, Fascien und Nerven befreit und in einer Fleischmühle zerkleinert. 100 g Fleischbrei werden in einem größeren Gefäß mehrmals mit kleinen Portionen von einer 0,25%igen Natriumchloridlösung übergossen und durchgeknetet, hierauf in ein feinmaschiges Tuch gebracht und die Natriumchloridlösung abgepreßt. Das Auswaschen wird fortgesetzt, bis die Masse weißgrau geworden ist. Ist dies eingetreten, wird der größte Teil des Natriumchlorids durch Kneten mit der zweifachen Menge Wassers fortgeschafft. Hierauf wird die Muskelmasse in einem Tuch durch schwaches Auspressen von überflüssigem Wasser befreit und darauf mit einer kleinen Menge von einer m/15 sek. Natriumphosphatlösung zu einem Brei während 10 Minuten verrieben. Dann wird mehr Natriumphosphatlösung zugesetzt, so daß im ganzen 200 ccm verwendet worden sind. Das Gemisch wird dann in einer Schüttelmaschine 30 Minuten lang langsam geschüttelt. Schüttelt man zu kräftig, riskiert man, das Enzym zu inaktivieren. Die Mischung wird zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit besitzt das Vermögen, Methylenblau zu entfärben, wenn entweder Bernsteinsäure oder Glycerinphosphorsäure in Form ihrer Kaliumsalze anwesend sind. Die Enzymlösung hält sich in der Kälte etwa 1 Woche.

Darstellung von Dehydrasen aus Pflanzensamen. Die Samenpflanzen konzentrieren in ihren Samen eine große Anzahl Dehydrasen. Die Dehydrasen der Samen sind meist leicht in Lösung überzuführen.

Samen, z. B. der Jutepflanze *Corchorus capsularis*, deren Extrakte wegen der geringen Spontanentfärbung besonders geeignet sind<sup>2</sup>, werden fein gemahlen und die Samenhülsen durch Sieben entfernt. Das so gewonnene gelbbraune Pulver wird mit dem 7,5fachen Volumen einer 0,43%igen sek. Kaliumphosphatlösung während 30 Minuten extrahiert. Während dieser Extraktion werden die einzelnen Samenpartikelchen mit einem Porzellanpistill in einem Porzellanmörser noch weiter zerkleinert.

Nach der Extraktion wird 20 Minuten scharf zentrifugiert und die über dem braunen Bodensatz stehende gelbgefärbte Flüssigkeit als Fermentextrakt verwendet. Das Enzym ist nicht sehr lange haltbar.

Nach DEUTICKE<sup>2</sup> ist die Hexosephosphat-Dehydrogenase aus pflanzlichem wie auch aus tierischem Material durch Muskeladenylsäure aktivierbar, nicht dagegen die Adenosintriphosphorsäure-Dehydrogenase. Nach EULER<sup>3</sup> ist die Hexosephosphat-Dehydrogenase aus pflanzlichem Material durch Dialyse von ihrem Aktivator trennbar; durch Zugabe von Co-Zymase aus Hefe wird das Enzym fast vollständig reaktiviert; demnach wäre für die Wirkung dieser Dehydrogenase Co-Zymase als Aktivator nötig.

#### e) Purindehydrase.

Der Purindehydrase fällt die Aufgabe zu, Xanthin und Hypoxanthin zu Harnsäure zu oxydieren; das Ferment ist sowohl in tierischen wie in pflanzlichen Zellen anzutreffen. Wiederum ist dieser Fermenttypus in der Milch am eingehendsten studiert worden; dort ist auch durch WIELAND und Mitarbeiter<sup>4</sup> zuerst wahrscheinlich gemacht worden, daß die Purindehydrase nicht identisch mit der Aldehydrase der Milch ist.

WIELAND stellt das wirksame Enzympräparat nach dem gleichen Verfahren her, das bei der Aldehydrase der Milch eingehend geschildert ist.

Das Enzym wird bestimmt nach der THUNBERG'schen Methylenblau-methode. Als Maß für die Purindehydrasewirkung stellt WIELAND die Xanthindehydrase-Einheit auf und definiert sie als diejenige Enzymmenge, die bei Gegenwart von 0,2 ccm 0,01 m Xanthin bei  $p_H = 8,0$  im Gesamtvolumen von 5,0 ccm 1 ccm 0,001 n-Methylenblau bei 37° in 5 Minuten entfärbt.

<sup>1</sup> T. THUNBERG: In „Methodik der Fermente“, herausgegeben von C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN, Leipzig 1929, S. 1118.

<sup>2</sup> H. J. DEUTICKE: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **192**, 193.

<sup>3</sup> H. v. EULER u. R. NILSON: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **194**, 260.

<sup>4</sup> H. WIELAND u. B. ROSENFELD: Ann. Chem. 1929, **477**, 32. — H. WIELAND u. T. F. MACRAE: Ann. Chem. 1930, **483**, 217.

### 3. Urikolytisches Enzym.

Die Harnsäure, die im tierischen Organismus als Abbauprodukt der Nucleinsäure auftritt, wird durch das urikolytische Enzym weiter abgebaut zu Allantoin. Man kann nach FELIX und Mitarbeitern<sup>1</sup> dabei zwischen zwei Teilfermenten unterscheiden; die Wirkung des urikolytischen Enzyms setzt sich aus einem oxydativen, nur bei Sauerstoffzutritt stattfindenden, und einem hydrolytischen, kohlenensäureabspaltenden Vorgang zusammen.

Das urikolytische Enzym kommt in Niere und Leber von Warmblütlern vor. Wirksame Extrakte daraus sind nach den üblichen Methoden darzustellen, doch sind solche Extrakte nach FELIX nicht lange genug haltbar. Man verwendet deshalb zweckmäßig mit Aceton und Äther getrocknete Organe, z. B. Schweineleber.

Zur Bestimmung der Urikasewirkung wird meist die Abnahme der Harnsäure, die man am besten colorimetrisch nach FOLIN und WU<sup>2</sup> oder nach F. FLATOW<sup>3</sup> mißt, herangezogen. Diese Methoden erfassen die Wirkung des oxydierenden Teilenzym und werden durch eine dritte kontrollierende Methode ergänzt. Da der erste Teil der Reaktion an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden ist, verfolgen FELIX und Mitarbeiter den Sauerstoffverbrauch gasvolumetrisch; diese Forscher stellen dafür eine Apparatur zusammen, die der für Hydrierungsversuche im allgemeinen verwendeten nachgebildet ist.

Den zweiten Teilvorgang, die Decarboxylierung zu Allantoin, bestimmt man durch Messung der entstehenden Kohlensäure nach der Methode von D. D. VAN SLYKE<sup>4</sup>.

Die beiden Teilenzyme besitzen nach FELIX verschiedene  $p_{\text{H}}$ -Optima, wodurch ihre Wirkung unterschieden werden kann. Bei  $p_{\text{H}} = 8,9$  wird nur wenig Kohlensäure gebildet, nur ein Bruchteil derjenigen, die aus der abgebauten Harnsäure zu erwarten ist. Unterbricht man den Versuch gerade in dem Punkt, wo alle Harnsäure abgebaut ist, so beträgt die Kohlensäureproduktion nur etwa ein Fünftel der berechneten. Das  $p_{\text{H}}$ -Optimum der Kohlensäureabspaltung liegt dagegen bei  $p_{\text{H}} = 9,9$ .

Messung der oxydierenden und decarboxylierenden Urikasewirkung nach FELIX. 20 mg Harnsäure werden gemeinsam mit 12 mg Lithiumcarbonat in 100 ccm Wasser in Lösung gebracht, mit 0,1 n-Natronlauge auf das gewünschte  $p_{\text{H}}$  (z. B. 9,9) gebracht und mit 10 ccm Boratpuffer nach SÖRENSEN vom nämlichen  $p_{\text{H}}$  und mit 300 mg Leberpulver versetzt.

Als Reaktionsgefäß dient ein größeres Reagensglas oder ein kleiner Kolben nach Art eines KJELDAHL-Kolbens, der mit einem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen ist. Durch das eine Loch führt ein am Ende etwas ausgezogenes Glasrohr bis zum Boden des Gefäßes, durch das andere ein kurzes, das unter dem Stöpsel endet. Durch das eine wird über eine Waschflasche mit 33%iger Natronlauge Sauerstoff in mäßigem Strom zugeleitet. Das kurze Rohr ist mit einer Vorlage verbunden, die 0,1 n-Barytlauge enthält, um die durch den Wasserstoffstrom ausgetriebene Kohlensäure aufzufangen. Die Vorlage hat zweckmäßig die Form des Absorptionsgefäßes, welches J. LINDNER<sup>5</sup> für die Mikrobestimmung des Kohlenstoffes angegeben hat. Das Reaktionsgefäß hängt in einem Thermostaten von 37°.

Den Fortgang der Reaktion mißt man nach FOLIN und WU bzw. nach F. FLATOW. Die in der Barytlauge aufgefangene Kohlensäure wird durch Titration mit 0,1 n-Salzsäure gegen Phenolphthalein, ferner die in der Reaktionsflüssigkeit verbliebene, nach dem manometrischen Verfahren von D. D. VAN SLYKE ermittelt.

Unter den angegebenen Bedingungen bauen beispielsweise 1 g Leberpulver 100 mg Harnsäure in etwa 5 Stunden vollständig ab.

### 4. Tyrosinase.

Die Tyrosinase oxydiert Tyrosin und andere hydroxylierte Benzolderivate (p-Kresol, Adrenalin, tyrosinhaltige Polypeptide) unter Bildung eines schwarzen Pigmentes, des Melanins. Zuerst entsteht durch die Enzymwirkung eine Rotfärbung, die allmählich immer dunkler wird und nach Stunden den Farbstoff, der in seiner Konstitution unbekannt ist, absetzt.

<sup>1</sup> K. FELIX, FR. SCHEEL u. W. SCHULER: Zeitschr. physiol. Chem. 1929, **180**, 90.

<sup>2</sup> O. FOLIN u. WU: Journ. Biol. Chem. 1919, **38**, 81.

<sup>3</sup> F. FLATOW: Biochem. Zeitschr. 1927, **176**, 178.

<sup>4</sup> D. D. VAN SLYKE u. J. N. NEILE: Journ. Biol. Chem. 1924, **61**, 523.

<sup>5</sup> J. LINDNER: Zeitschr. analyt. Chem.



Das Enzym kommt sowohl in tierischem als auch in pflanzlichem Material vor. Wirksame Tyrosinlösungen liefern die Puppen des Wolfsmilchschwärmers, ferner Mehlwürmer und die Drüse des Tintenfisches. Pflanzliche Tyrosinase wird am besten aus der Kartoffel gewonnen; am reichhaltigsten an dem Enzym erwiesen sich Pilze aus der Gattung *Russula*.

Zur Bestimmung der Tyrosinasewirkung dienen zwei Methoden. Nach der Methode von BACH<sup>1</sup> wird das aus dem Tyrosin gebildete Melanin durch Permanganatlösung wieder entfärbt; auf diese Weise kann seine Menge titrimetrisch bestimmt werden. Nach der Methode von RAPER und WORMALL<sup>2</sup> wird nach Ausfällung des Melanins und Zerstörung des Enzyms die Menge des nicht umgewandelten Tyrosins bestimmt. Letztere Methode ist komplizierter, führt aber zu exakteren Ergebnissen. Für schnelle Orientierungsversuche ist die BACHsche Methode vorzuziehen.

Aus der Menge des verbrauchten Tyrosins nach einem bestimmten Zeitintervall berechnet man nach der Gleichung für monomolekulare Reaktionen die Geschwindigkeitskonstante  $k$ . Die Reaktion ist nach RAPS und WORMALL annähernd monomolekular. Um Tyrosinasen verschiedener Herkunft und verschiedener Reinheit vergleichen zu können, bestimmen H. HAEHN und L. STERN<sup>3</sup> die Oxydationsfähigkeit der Tyrosinase ( $T_f$ ).

$$T_f = \frac{k \cdot 10^5}{G} .$$

$k$  bedeutet die Geschwindigkeitskonstante der monomolekularen Reaktion,  $G$  die Trockensubstanz des dem Versuch hinzugefügten Enzympräparates in Gramm. Der Faktor  $10^5$  soll das Resultat auf ganze Zahlen bringen.

#### Bestimmung der Tyrosinasewirkung.

α) Methode nach BACH: 10 ccm nötigenfalls verdünnte Fermentlösung werden mit 10 ccm Tyrosinlösung und 30 ccm Wasser versetzt. Die Tyrosinlösung wird bereit durch Lösen von 0,05 g Tyrosin in 100 ccm einer 0,04%igen Natriumcarbonatlösung in der Wärme. Nach H. HAEHN<sup>4</sup> ist es zweckmäßig, wenn man das Tyrosin in 100 ccm  $\frac{1}{15}$  Mol. Phosphatpuffer  $p_H = 6,8$  löst. Das Gemisch wird im Thermostaten z. B. 24 Stunden belassen. Nach Ablauf dieser Frist wird das Gemisch mit 1 ccm 10%iger Schwefelsäure angesäuert und mit 0,002 n-Permanganatlösung bis zur Entfärbung titriert. Die Permanganatmengen, die zur Entfärbung der ursprünglichen, bräunlich gefärbten Fermentlösung erforderlich sind werden abgezogen.

β) Methode nach H. S. RAPER und A. WORMALL<sup>5</sup>: Erforderliche Lösungen: 1. Tyrosinlösung: 0,15 g Tyrosin werden in 300 ccm  $\frac{1}{15}$  Mol.-Phosphatpuffer von  $p_H = 6,81$  gelöst. — 2. 10%ige Essigsäure. — 3. 10%ige Natriumcarbonatlösung. — 4. Natriumbromatlösung: 0,8502 g in 1 Liter (1 ccm = 0,001527 g Tyrosin). — 5. 50%ige Kaliumbromidlösung. — 6. 20%ige Salzsäure. — 7. 10%ige Kaliumjodidlösung. — 8.  $\frac{1}{15}$ - $\frac{1}{50}$  n-Natriumthiosulfatlösung.

In einem Stehkolben von 500 ccm Inhalt bringt man 300 ccm der Tyrosinlösung, fügt z. B. 30 ccm Kartoffelsaft hinzu und 10 ccm Toluol. Der Kolben wird mit einem Gummistopfen verschlossen, bei 20° gehalten und ein mit Wasserdampf und Toluol gesättigter Luftstrom durch das Reaktionsgemisch geschickt.

Ein Kontrollversuch mit 300 ccm Phosphat-Puffermischung, 30 ccm Kartoffelsaft und 10 ccm Toluol dient zur Korrektur des Tyrosinwertes in bezug auf bromadsorbierende Substanzen des Enzymsaftes.

Zum Beginn des Versuches nimmt man aus jedem Kolben eine Probe von 20 ccm zur Bestimmung der Anfangskonzentration des Tyrosins. Weiterhin werden in Abständen von beispielsweise ganzen Stunden Proben von 20 ccm entnommen, um darin die noch nicht umgewandelte Tyrosinmenge zu bestimmen. Die entnommenen Proben werden sofort mit 0,5 ccm 10%iger Essigsäure versetzt, zur Zerstörung des Enzyms und zur Ausfällung der Eiweißstoffe aufgeköcht und zur Ausfällung der Melaninstoffe 2 Tage lang

<sup>1</sup> A. BACH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, 41, 216.

<sup>2</sup> H. S. RAPER u. A. WORMALL: Biochem. Journ. 1923, 17, 454.

<sup>3</sup> H. HAEHN u. L. STERN: Ferment-Forsch. 1928, 9, 395.

<sup>4</sup> H. HAEHN: Die Bestimmung der Tyrosinase in „Methodik der Fermente“, herausgegeben von C. OPPENHEIMER und L. PINCUSSEN, Leipzig 1929, S. 1364.

<sup>5</sup> H. S. RAPER u. A. WORMALL: Biochem. Journ. 1923, 17, 454.

stehen gelassen. Dann wird filtriert, der Melanin-Eiweißniederschlag zur Entfernung des anhaftenden Tyrosins mehrere Male mit heißem Wasser ausgewaschen und das Filtrat mit 2 ccm 10%iger Natriumcarbonatlösung alkalisch gemacht. Nachdem wieder aufgekocht war, bleibt die Probe noch 24 Stunden stehen. Hierauf werden 2 ccm 10%iger Essigsäure zugefügt, die Lösung wieder gekocht, einige Stunden stehen gelassen und endlich filtriert.

Die Bestimmung des Tyrosins wird nun nach der Methode von MILLAR<sup>1</sup> ausgeführt. Man versetzt die Tyrosinlösung mit 10 ccm der Natriumbromatlösung, 2 ccm der 50%igen Kaliumbromidlösung und 7,5 ccm der 20%igen Salzsäure und läßt das Reaktionsprodukt 20 Minuten im verschlossenen Kolben stehen. Dann werden 2 ccm der 10%igen Jodkaliumlösung zugefügt und das freie Jod mit z. B.  $\frac{1}{15}$  n-Natriumthiosulfat titriert.

Berechnung: Der Titer der Natriumbromatlösung wird zuerst durch Titration mit Natriumthiosulfat festgestellt; diese Titration wird ausgeführt genau wie oben angegeben, nur ohne Zusatz von Tyrosin. Die Prüfung der Methode erfolgt zweckmäßig in einem Kontrollversuch.

Beispiel: Einwaage 0,010 g Tyrosin.

|  |   |
|--|---|
| Das Brom der 10 ccm Bromatlösung verbraucht . . .  | 4,95 ccm $\frac{1}{15}$ n-Thiosulfatlösung  |
| Nach Zugabe von 0,010 g Tyrosin verbraucht der     |   |
| Rest Brom der 10 ccm-Bromatlösung . . . . .        | 1,70 „ $\frac{1}{15}$ „                     |
| Das mit Tyrosin umgesetzte Brom entspricht demnach | 3,25 ccm $\frac{1}{15}$ n-Thiosulfatlösung. |

3,25 ccm Thiosulfat entsprechen 6,57 ccm Bromatlösung (da 4,95 ccm Thiosulfat 10 ccm Bromatlösung entsprechen); 6,57 ccm Bromatlösung = 0,0101 g Tyrosin (da 1 ccm Bromatlösung = 0,00153 g Tyrosin ist).

Die umständliche Behandlung des Reaktionsgemisches vor der Bromierung, die die Analyse an einem Tag nicht zu Ende führen läßt, kann durch eine von H. HAEHN<sup>2</sup> angegebene Methode vermieden werden. Die Pigmente und ihre Zwischenprodukte werden in stark natriumcarbonatalkalischer Lösung mit Hilfe von Bariumchlorid so vollständig niedergeschlagen, daß sofort ein klares Filtrat entsteht. Tyrosin geht dabei nicht verloren.

Ausführung. Nachdem man die Probe wie oben mit 0,5 ccm 10%iger Essigsäure zur Zerstörung des Enzyms und zur Ausfällung der Eiweißstoffe aufgekocht hat, läßt man nur 10 Minuten stehen, filtriert den Melanin-Eiweißniederschlag ab, wäscht ihn zur Entfernung des Tyrosins dreimal mit heißem Wasser aus, und zuletzt mit 10 ccm 10%iger Sodalösung. Dann wird wieder aufgekocht und die Probe mit 4 ccm 10%iger Bariumchloridlösung versetzt. Nach dem Aufkochen wird filtriert und der Niederschlag 2—3mal mit heißem Wasser ausgewaschen. Hierauf werden 10 ccm 10%iger Essigsäure zugefügt und die Lösung wieder aufgekocht. Die Proben bleiben nun bis zur Abkühlung stehen; sind sie klar geblieben, so kann sofort zur Titration geschritten werden, andernfalls muß noch einmal filtriert werden.

### Darstellung von Tyrosinase-Präparaten.

a) Pflanzliche Tyrosinase. Bereitung aus Kartoffelsaft. Die Knollen werden gewaschen, fein gerieben, der Brei in einem Beutel mit einer Handpresse ausgepreßt. Man läßt den frischen Saft etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde stehen und zentrifugiert die Stärke und sonstige Beimengungen ab.

Eine Reinigung erzielt man nach H. HAEHN<sup>3</sup> durch Dialyse in Fischblasen. Dabei tritt eine weitgehende Inaktivierung ein, die durch Zugabe von Phosphat wieder aufgehoben wird.

Ähnlich wie aus Kartoffeln werden Tyrosinaselösungen aus Rüben, Pilzen oder anderem pflanzlichen Material gewonnen.

Die Darstellung eines Trockenpräparates beschreibt E. ABDERHALDEN<sup>4</sup> wie folgt:

10 g *Russula emetica* des Handels werden mit 100 g Glycerin verrührt, 24 Stunden stehen gelassen und dann abgenutscht. Es resultiert ein sehr wirksamer rotbrauner Auszug, von großer Haltbarkeit. Der Glycerinextrakt wird mit der 6fachen Menge Alkohol versetzt. Es wird schnell abfiltriert und der sich nachträglich bildende Niederschlag abzentrifugiert. Der Niederschlag wird zweimal mit Alkohol gewaschen und darauf im Exsiccator getrocknet.

<sup>1</sup> Vgl. hierzu O. v. FÜRTH u. FLEISCHMANN: Biochem. Zeitschr. 1921, 127, 143.

<sup>2</sup> H. HAEHN u. J. STERN: Biochem. Zeitschr. 1927, 184, 182.

<sup>3</sup> H. HAEHN: Biochem. Zeitschr. 1920, 105, 175.

<sup>4</sup> E. ABDERHALDEN u. M. BEHRENS: Ferment-Forsch. 1926, 8, 479.

Tierische Tyrosinase. Nach HAEHN<sup>1</sup> werden zur Bereitung des Enzyms aus Mehlwürmern 10 Mehlwürmer mit etwa 10 ccm Chloroformwasser übergossen und in der Reibschale gründlich verrieben. Nach Abzentrifugieren von den groben Zellresten ist die Enzymlösung gebrauchsfertig. Nach W. BIEDERMANN<sup>2</sup> benutzt man nur die Mitteldärme von Mehlwürmern.

Auch aus den Puppen des Wolfsmilchschwärmers werden nach C. v. FÜRTH<sup>3</sup> wirksame Auszüge gewonnen.

## 5. Katalase.

Die Katalase beschleunigt den Zerfall von Wasserstoffsuperoxyd in Wasser und Sauerstoff; ihre Wirkung ist streng spezifisch und nicht auf andere Peroxyde übertragbar. Das Enzym findet sich in fast allen pflanzlichen und tierischen Geweben und Flüssigkeiten, oft in großer Konzentration.

### a) Bestimmungsmethoden.

Zur Bestimmung der Katalase stehen zwei Methoden zur Verfügung, die Titration des nicht verbrauchten Wasserstoffsuperoxyds mit Permanganatlösung und die gasvolumetrische Bestimmung des entwickelten Sauerstoffs.

Die titrimetrische Methode eignet sich dann, wenn ein einigermaßen reines Enzympräparat geprüft wird, dessen Trockensubstanz nicht selbst Permanganat verbraucht; ferner darf das Enzymmaterial keine merklichen Peroxydase-mengen enthalten. Der Reaktionsverlauf ist nach S. HENNICHS<sup>4</sup> unter bestimmten Bedingungen (Temperatur 0°, geringe Substratkonzentration) monomolekular, so daß die Reaktionskonstante des monomolekularen Zeitgesetzes zugleich ein Maß für die Katalasewirkung darstellt.

Nach HENNICHS<sup>4</sup> verfährt man zur Bestimmung folgendermaßen: Eine Anzahl ERLÉNMEYER-Kolben von 100 ccm Inhalt werden mit 35 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung zwischen 0,02 und 0,005 n gefüllt. Da sich der Titer der Wasserstoffperoxydlösung täglich ändert, stellt man ihn durch Titration mit Kaliumpermanganat fest. Als Puffer werden 10 ccm  $\frac{1}{30}$  m-Phosphatlösung vom  $p_H = 6,8$  verwandt. Durch Zusatz von 4 ccm Wasser wird auf 50 ccm aufgefüllt. Der Inhalt der Kölbchen wird in einem Eisbad auf 0—0,5° abgekühlt. Zu Beginn der Reaktion wird die Enzymlösung zugesetzt (1—4 ccm) und sofort nach dem Umschütteln die erste Probe mit 5 ccm entnommen und später in gleicher Weise jede 5. Minute. Die Proben werden in ERLÉNMEYER-Kolben, die 10 ccm Schwefelsäure enthalten, pipettiert, wonach sie mit einer etwa 0,005 n-Permanganatlösung (Titer mit Natriumoxalat eingestellt) titriert werden.

Man erhält die Reaktionskonstante  $k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$ , wenn man  $a =$  ccm Permanganatlösung, die am Anfang des Versuchs verbraucht werden, und  $a - x =$  ccm nach der Versuchszeit  $t$  setzt. Zur Berechnung des Enzymwertes (kat. f.) werden die Durchschnittszahlen aus 3—5 Messungen von  $K$  durch die Menge Trockensubstanz dividiert, welche das der Reaktionsmischung (50 ccm) zugesetzte Volumen Enzymlösung enthält.

Volumetrische Bestimmung der Katalase nach BATELLI und STERN<sup>5</sup>. Die zur volumetrischen Messung der Katalasewirkung dienende Apparatur besteht im wesentlichen aus einem ERLÉNMEYER-Kolben von 100 ccm Inhalt, der mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen werden kann.

<sup>1</sup> H. HAEHN: Ferment-Forsch. 1921, 4, 130.

<sup>2</sup> W. BIEDERMANN: Pflügers Arch. 1898, 72, 105.

<sup>3</sup> O. v. FÜRTH u. H. SCHNEIDER: Hofmeisters Beitr. 1902, 1, 234.

<sup>4</sup> S. HENNICHS: Biochem. Zeitschr. 1924, 145, 286.

<sup>5</sup> L. STERN u. F. BATELLI: „Katalase“ in „Methoden der Fermente“ von C. OPPENHEIMER u. L. PINCUSSEN 1929, S. 1373; ferner Erg. Physiol. 1910, 10, 544.

Der Kolben steht einerseits mit einem gut graduierten Eudiometer von 50 ccm in Verbindung, andererseits mit einer zur Aufnahme der Wasserstoffsuperoxydlösung dienenden Bürette. Der Reaktionskolben ist in einem Thermostaten mit Schüttelvorrichtung befestigt.

10 ccm der zu untersuchenden, entsprechend verdünnten Enzymlösung werden in den ERLÉNMEYER-Kolben gebracht. Nach Ausgleich der Temperatur in dem ERLÉNMEYER-Kolben wird die Luft aus dem Eudiometer durch Wasser verdrängt und durch entsprechende Einstellung des Dreiwegehahnes der ERLÉNMEYER-Kolben mit dem Eudiometer in Verbindung gesetzt. Hierauf wird geschüttelt und aus der Bürette 10 ccm 1%iger Wasserstoffsuperoxydlösung in das Reaktionsgefäß fließen gelassen. Der bei der Zersetzung entstehende gasförmige Sauerstoff verdrängt das entsprechende Wasservolumen im Eudiometer und kann hier ohne Unterbrechung des Versuchs dauernd gemessen werden. Die durch das Einfließen der Wasserstoffperoxydlösung verursachte Gasverdrängung wird von dem gesamten Gasvolumen abgezogen. Das entstandene Gas wird auf 0° und 760 mm reduziert und hieraus, wenn nötig, die zersetzte Wasserstoffsuperoxydmenge berechnet. Man darf nur absolut reine Peroxydpräparate verwenden. Die Verdünnung geschieht am besten mit  $\frac{1}{100}$  Mol. Phosphatpuffer von  $p_H = 6,8$ . Die Messung der Katalasewirkung erfolgt nach BATELLI und STERN bei Zimmertemperatur. Die Versuchsdauer beträgt 5 Minuten. Nach MORGULIS<sup>1</sup> wird zweckmäßig die Reaktion in Abständen von je 5 Minuten bis zum Endpunkt der Spaltung verfolgt.

Die volumetrische Meßmethode eignet sich besonders zur Bestimmung der Katalase in Geweben und Gewebsflüssigkeiten. Peroxydase stört hierbei die Meßergebnisse nicht.

Nach BATELLI und STERN<sup>2</sup> ist die Katalasewirkung stark beeinflussbar durch einen in Geweben vorkommenden Hemmungskörper — Antikatalase —, dessen Wirkung wiederum aufgehoben werden kann durch die sog. Philokatalase. Ähnlich wie Philokatalase wirken einige Stoffe, wie z. B. Alkohol, Aldehyd, und zwar bereits in minimalen Konzentrationen wie 1:10000. Auf diese Beobachtung gründet sich der Nachweis der Antikatalase.

### β) Darstellung von Katalasepräparaten.

Verfahren nach S. HENNICH<sup>3</sup>; vgl. auch BATELLI und STERN<sup>2</sup>.

1 kg frischer, fein zermahlener, wenn nötig durchgespülter Leber (von Pferd), die eine Aktivität kat.  $f. = 60$  besitzt, wird mit 1 Liter Wasser 1 Stunde lang extrahiert. Mittels Kolierung durch ein Tuch erhält man eine kolloide Lösung von kat.  $f. = 500-900$ , die 25—35% der Trockensubstanz der Leber und 300—400% ihrer totalen Aktivität enthält. Ein hemmender Einfluß hat somit aufgehört oder ist vermindert worden. Die Lösung wird nun unter Eiskühlung mit dem halben Volumenteil 96%igen Alkohols unter kräftigem Umrühren gefällt. Die Fällung, die fast inaktiv ist, wird abzentrifugiert. Die rotgefärbte Restlösung ist klar und besitzt eine Aktivität von kat.  $f. = 2000-3000$ . Hierauf wird wiederum bis 0° abgekühlt und mit dem gleichen Volumen 96%igen Alkohols wie vorher gefällt. Die entstandene Fällung wird abzentrifugiert und mit Wasser, z. B. 1,5 Liter, 3 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt. Man erhält Lösungen von kat.  $f. = 4000-6000$ .

Die so bereiteten Enzymlösungen können durch Adsorption an Tonerde  $C\gamma$ , sowie nach HENNICH<sup>3</sup> besonders gut durch Adsorption an Kaolin weiter gereinigt werden. Zur vollständigen Adsorption ist die 10—15fache Menge Kaolin gegenüber der Trockensubstanzmenge des Enzyms erforderlich. Das  $p_H =$  Optimum der Adsorption liegt bei  $p_H = 5$ . Die Elution gelingt am besten mit einer 0,5 bis 0,8%igen  $Na_2HPO_4$ -Lösung; sie besitzt eine Aktivität von kat.  $f. = 20000$  bis 25000. Ausbeute der totalen Aktivität etwa 30%.

EULER und JOSEPHSON<sup>4</sup> erreichen durch Einschaltung einer Dialyse in den Gang der Reinigung noch eine beträchtliche Steigerung der Aktivität.

<sup>1</sup> MORGULIS: Journ. Biol. Chem. 1921, 47, 341.

<sup>2</sup> F. BATELLI u. L. STERN: Journ. Physiol. et Path. gén. 1905, 7, 919. — Biochem. Zeitschr. 1908, 10, 275. — Erg. Physiol. 1910, 10, 544. — L. STERN: Biochem. Zeitschr. 1927, 182, 139.

<sup>3</sup> S. HENNICH: Biochem. Zeitschr. 1924, 145, 286.

<sup>4</sup> H. v. EULER u. K. JOSEPHSON: Ann. Chem. 1927, 452, 158; 455, 1.

### γ) Eigenschaften der Katalase.

Die Katalase gehört zu den wenigen Enzymen, über deren aktive Gruppen wir einige Anhaltspunkte besitzen. Nach K. ZEILE und H. HELLSTRÖM<sup>1</sup> ist nämlich die aktive Gruppe der Katalase ein Porphyrin-Eisenkomplex, der durch sein spezifisches spektrophotometrisch gemessenes Verhalten charakterisiert ist. Auf Grund des Verhaltens bei Isolierungsversuchen ist zu schließen, daß Porphyrineisen eine wesentliche Komponente der katalatischen Reaktion darstellt. Für ein Katalasepräparat von kat. *f.* = 43000 wird ein „Hämingehalt von 0,60% angegeben.

Die Katalase liefert eine dissoziablen Blausäure- und Schwefelwasserstoffverbindung; dadurch läßt sich die reversible Hemmbarkeit der katalatischen Reaktion durch diese Gifte erklären.

Die reinsten von EULER dargestellten Katalasepräparate zeigen eine positive Eiweißreaktion, einen Stickstoffgehalt von 15%, einen Schwefelgehalt von etwa 1% und einen Eisengehalt von 0,15–0,63%.

Außer dem Enzym Katalase zeigen andere Porphyrin-Eisenkomplexe ebenfalls katalatische Wirkung, wenngleich in viel geringerem Maße. So ist Hämin nach KUHN und Mitarbeitern<sup>2</sup> etwa 10000mal schwächer katalatisch aktiv als Katalase und ähnlich andere durch EULER und Mitarbeiter<sup>3</sup> untersuchte Hämintypen. Auch Hämoglobin zeigt nach HAUROWITZ eine scharf katalatische Wirkung<sup>4</sup>.

## 6. Peroxydase.

Die Wirkung der Peroxydase besteht in der Übertragung peroxydisch gebundenen Sauerstoffs, z. B. von Hydroperoxyd, von Äthylhydroperoxyd und ähnlichen Verbindungen auf oxydable Substanzen. Als Vermittler biologischer Oxydationen spielen peroxydatische Enzyme eine große Rolle. Sie sind außerordentlich verbreitet; in besonders reichlicher Menge finden sie sich in den Wurzeln und in den Samenkeimlingen höherer pflanzlicher Organismen. Als Ausgangsmaterial dienen vor allem Meerrettichwurzel, ferner weiße Rüben und Weizenkeimlinge. Den Peroxydasegehalt von pflanzlichen Materialien haben R. WILLSTÄTTER und A. POLLINGER<sup>5</sup> bestimmt. Im tierischen Organismus kommt dem Oxyhämoglobin peroxydatische Wirkung zu; sie ist indes nach WILLSTÄTTER<sup>6</sup> etwa 1000–30000mal schwächer als die der besten bis jetzt gewonnenen Präparate aus Meerrettich.

### α) Bestimmung der Peroxydasewirkung.

Für den Nachweis und die Bestimmung peroxydatischer Enzyme bedient man sich der Oxydation organischer Farbbasen, z. B. der Bildung von Malachitgrün aus seiner Leukoverbindung oder der Oxydation von Phenolen, z. B. der Bildung von Purpurogallin, einem orangeroten, ätherlöslichen Farbstoff, aus Pyrogallol, in Gegenwart von Hydroperoxyd.

Pyrogalloloxydation nach WILLSTÄTTER und STOLL<sup>7</sup>. Pyrogallol wird bei Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxyd durch Peroxydase zu dem Farbstoff

<sup>1</sup> K. ZEILE u. HELLSTRÖM: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **195**, 39; 1930, **192**, 171.

<sup>2</sup> KUHN u. BRANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, **59**, 2370. — R. KUHN u. WASSERMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1928, **60**, 1550. — KUHN u. BRANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, **168**, 27.

<sup>3</sup> H. v. EULER: Svensk kem. T. 1929, **4**, 89.

<sup>4</sup> F. HAUROWITZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, **198**, 9.

<sup>5</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. POLLINGER, in „Untersuchungen über Enzyme“ von R. WILLSTÄTTER, Berlin 1928, Bd. I, S. 521.

<sup>6</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. POLLINGER: Zeitschr. physiol. Chem. 1923, **130**, 281.

<sup>7</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. STOLL: Ann. Chem. 1918, **416**, 21.

Purpurogallin oxydiert, der nach Ablauf der Reaktionszeit ausgeäthert wird und dessen Menge colorimetrisch in der Ätherlösung bestimmt wird. Zur Konstitution des Purpurogallins vgl. R. WILLSTÄTTER und H. HEISS<sup>4</sup>. Bei Anwendung sehr verdünnten Hydroperoxyds und verhältnismäßig hoher Konzentration von Pyrogallol, ist der Umsatz in der Zeiteinheit der Enzymmenge proportional.

Ausführung. 2,0 Liter Wasser von 20,0°, worin 5 g reinsten Pyrogallols gelöst sind, werden im Rundkolben, der sich im Bade von der gleichen konstanten Temperatur befindet, kräftig gerührt. Man trägt etwa 10 ccm 0,5%igen Hydroperoxyds, das aus MERCK'schem Perhydrol durch Verdünnen erhalten, in einer paraffinierten Flasche aufbewahrt und von Zeit zu Zeit titriert wird, mit einem Gehalt von genau 50,0 mg Wasserstoffsuperoxyd in die Pyrogallollösung ein und dann im Augenblick des Versuchsbeginns die Peroxydase, z. B. 0,25 mg von wenig wirksamem Rohprodukt bis herunter zu 0,02 mg von einem gereinigten Präparat, in Form von 1—5 ccm Lösung aus 5 mg Enzym in 100—500 ccm Wasser. Die Gelbfärbung tritt sofort ein und vertieft sich. Nach genau 5 Minuten wird die Reaktion durch Eintragen von 50 ccm reiner (eisenfreier) verdünnter Schwefelsäure unterbrochen. Ohne längeres Stehen der Flüssigkeit wird das Purpurogallin in 3 oder 4 Malen erschöpfend ausgeäthert, wobei die wäßrige Schicht infolge spurenweiser Bildung eines Nebenproduktes gewöhnlich schwach gefärbt bleibt. Die ätherische Lösung, 250 oder 500 ccm, bestimmt man im Colorimeter mit einer Vergleichslösung, die 100 mg aus Alkohol und aus Äther umkrystallisierten Purpurogallins in 1 Liter Äther enthält. Die Darstellung von Purpurogallin erfolgt entweder enzymatisch oder durch Oxydation von Pyrogallol mit Ferricyanid nach R. WILLSTÄTTER und H. HEISS<sup>1</sup>.

Die Methode liefert auf wenige Zehntelmilligramme von Purpurogallin genaue Resultate. Die Purpurogallinausbeute ist unter den angegebenen Bedingungen der Enzymmenge proportional, wenn sie nicht die Grenzen von 15—20 mg erheblich überschreitet. Ist dies der Fall, so muß die Bestimmung mit geringerer Enzymmenge wiederholt werden.

Zum Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Präparate oder der Konzentration der in ihnen enthaltenen Enzymmengen bezieht WILLSTÄTTER die in 5 Minuten unter den angegebenen Versuchsbedingungen gebildete Purpurogallinmenge auf 1 mg des angewandten getrockneten Präparates und nennt sie „Purpurogallin-Zahl“. Diese Zahl bedeutet also die von 1 mg Enzympräparat im Medium von 5 g Pyrogallol und 50,0 mg Wasserstoffsuperoxyd, gelöst in 2 Liter Wasser von 20°, in 5 Minuten gebildete Menge Purpurogallin in Milligrammen.

Als „Peroxydaseeinheit“<sup>2</sup> wird 1 g Substanz von der Purpurogallinzahl 1 oder 1 mg Peroxydasepräparat von der Purpurogallin-Zahl 1000 bezeichnet. Dieses Menge-Wert-Produkt ergibt sich aus der Multiplikation der Purpurogallin-Zahl mit der vorhandenen Substanzmenge in Milligramm.

Eine zur raschen Schätzung von Peroxydaseeinheiten geeignete colorimetrische Methode unter ähnlichen Bedingungen geben R. KUHN und Mitarbeiter an<sup>3</sup>.

Bestimmung der Peroxydasewirkung durch Oxydation von Leukomalachitgrün. Die Oxydation des Leukomalachitgrün wurde zu quantitativen Peroxydasebestimmung zuerst von E. v. CZYHLARZ u. v. FÜRTH<sup>4</sup> benutzt. Die von WILLSTÄTTER u. WEBER<sup>5</sup> verbesserte Methode gestaltet sich folgendermaßen:

Benötigte Reagenzien. 1. Mit der viermal (zweimal aus Alkohol, dann aus Ligroin und nochmals aus Alkohol) umkrystallisierten Leukobase wird titrierte 0,05 n-Essigsäure gesättigt; es lösen sich 10 mg Leukomalachitgrün in 100 ccm 0,05 n-Essigsäure. Die

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. H. HEISS: Ann. Chem. 1923, 433, 17.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. POLLINGER: Ann. Chem. 1923, 430, 269.

<sup>3</sup> R. KUHN, D. B. HAND u. M. FLORIN: Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 201, 255.

<sup>4</sup> E. v. CZYHLARZ u. O. v. FUERTH: Hofmeisters Beitr. 1907, 10, 358.

<sup>5</sup> R. WILLSTÄTTER u. H. WEBER: Ann. Chem. 1926, 449, 156.

Lösung, an der Pumpe von Luft befreit, hält sich monatelang ohne grünliche Farbe anzunehmen. — 2. Toluolgesättigte 0,166 n-Lösung von Natriumacetat. — 3. Das Hydroperoxyd wird aus reinem Perhydrol MERCK durch Verdünnen auf das Hundertfache bereitet und vor dem Gebrauch mit Permanganat eingestellt. Aus der Titration wird die weitere Verdünnung berechnet, um 0,25 mg Wasserstoffsperoxyd stets im gleichen Volumen von 1,0 ccm zu haben.

Ausführung. Zu 100 ccm des Essigsäureleukomalachitgrün-Gemisches setzt man 2 ccm 0,166 n-Natriumacetatlösung und 1 ccm 25 mg-% Hydroperoxyd hinzu. In diese Mischung, die im Thermostaten auf 20° temperiert wird, trägt man die Peroxydaseelösung ein. Es sollen in 5 ccm nicht mehr als 0,0025—0,05 Peroxydaseeinheiten enthalten sein. Zur Unterbrechung des Versuches gießt man im Augenblick des Reaktionsablaufes 10 ccm n-Schwefelsäure aus einem Kölbchen in einem Gusse ein, spült den im Kölbchen zurückgebliebenen Rest der Schwefelsäure mit 5 ccm Wasser nach. Nach 15—20 Sekunden neutralisiert man die Mineralsäure mit etwas mehr als der äquivalenten Menge Natriumcarbonatlösung entspricht. Durch das Zusetzen der Schwefelsäure erhält das Malachitgrün einen blaugrünen Farbton, doch kehrt die ursprüngliche Farbe bei der Neutralisation sofort zurück. Zum Vergleich bedient man sich einer 10,00 mg Malachitgrün im Liter enthaltenden 0,05 n-Essigsäurelösung in einer Schichtdicke von 5—10 mm. Die Testlösung wird durch Toluolzusatz haltbar gemacht und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Zur colorimetrischen Messung des Malachitgrünes ist künstliches Licht geeigneter als Tageslicht.

Der Bereich der Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz ist bei dieser Bestimmungsart viel ausgedehnter als bei Anwendung von Pyrogallol als Substrat. Bei Enzymbestimmungen von Suspensionen z. B. von Pflanzenmaterial sind einige Abänderungen nötig, da der Farbstoff an oberflächenaktiven Stoffen adsorbiert wird. Für die Isolierung von adsorbiertem Malachitgrün eignet sich Chloroform.

Das Malachitgrünäquivalent der Purpurogallinzahl ist mit Peroxydaseproben von verschiedenen Reinheitsgraden konstant gefunden worden; 1 mg Purpurogallin, das unter den Bedingungen der Purpurogallinmethode entsteht, entsprechen 0,053 mg Malachitgrün unter den angegebenen Verhältnissen. Also ist eine Peroxydaseeinheit gleich 1 mg Enzym von der Malachitgrünzahl 53.

Neben der Oxydation von Pyrogallol und Leukomalachitgrün ist die Oxydation von Guajacol<sup>1</sup> und Jodwasserstoffsäure<sup>2</sup> zur quantitativen Bestimmung von Peroxydase herangezogen worden.

### β) Darstellung von Peroxydasepräparaten nach WILLSTÄTTER und STOLL<sup>3</sup>.

Von 5 kg Meerrettich werden die schadhafte Stellen entfernt; hierauf werden die Wurzeln einen Tag in Wasser gelegt. Nachdem sie hierdurch zum Schnitzeln vorbereitet sind, schneidet man sie quer zur Wurzelachse in Scheiben von  $\frac{1}{2}$ —1 mm Dicke zweckmäßig mit einem Holzhebel. Darauf werden die Schnitzel 6—8 Tage durch fließendes Leitungswasser dialysiert (Strömungsgeschwindigkeit 100—150 Liter in der Stunde). Während dieser Zeit bräunen sich die Wurzeln oberflächlich. Darauf werden die Schnitzel an der Pumpe möglichst trocken gesaugt und unter häufigem Umrühren 3 Stunden in 15 Liter Wasser, die 30 g Oxalsäure enthalten, digeriert. Das Enzym wird hierdurch fast quantitativ niedergeschlagen. Die Schnitzel werden dann von der trüben, stark senföhlhaltigen Flüssigkeit auf der Nutsche abgesaugt und abgepreßt (Gewicht jetzt etwa 3 kg) und in einer Syenitwalzenmühle mit immer enger gestellten Walzen 3—4mal zu einem dünnen plastischen Brei zerkleinert. Dieser Brei wird mit 6—8 Liter Wasser vermischt, in einer Steinzeugnutsche durch ein Koliertuch filtriert und unter Vermeidung des Trockensaugens mit etwa 15 Liter Wasser, das 1,5 g Oxalsäure enthält, über Nacht nachgewaschen. Nun wird der scharf abgesaugte Rückstand in eine doppelte Lage Koliertuch eingepackt und unter der Hebelpresse nach wiederholter Zerteilung mehrmals scharf abgepreßt (Gewicht jetzt etwa 1,5 kg). Zu dem fein zerriebenen Rückstand wird langsam 1 Liter halb gesättigter Bariumhydroxydlösung zugesetzt. Die Suspension bleibt bei dieser Behandlung schwach sauer. Die Faser färbt sich jetzt gelb. Es ist wichtig, diese Maßnahme

<sup>1</sup> A. BACH u. S. ZUBKOWA: Biochem. Zeitschr. 192, 125, 288.

<sup>2</sup> A. BACH u. R. CHODAT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, 35, 2466. — R. KUHN u. L. BRANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, 59, 2370.

<sup>3</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. STOLL: Ann. Chem. 1918, 416, 21. — R. WILLSTÄTTER: Ann. Chem. 1921, 422, 47.

sehr vorsichtig auszuführen und durch gründliches Verarbeiten der ungleichmäßigen Verteilung des Alkalis vorzubeugen. Nach halbständigem Kneten und Verreiben wird unter der Presse abgepreßt, wobei man gewöhnlich etwas mehr als 1 Liter eines mäßig wirksamen Extraktes erhält. Der Preßrückstand wird jetzt abermals fein zerteilt und mit  $1\frac{1}{4}$  Liter bei  $20^{\circ}$  gesättigter Bariumhydroxydlösung angerührt. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde erfolgt scharfes Abpressen, wobei man etwas mehr als  $1\frac{1}{2}$  Liter eines sehr aktiven Fermentauszuges gewinnt, der sofort unter Schütteln mit Kohlensäure bis zu schwach saurer Reaktion bearbeitet wird. Man kann den Preßkuchen noch einmal mit je  $1\frac{1}{2}$  Liter halbgesättigter Bariumhydroxydlösung extrahieren, wobei man schwächere, aber ebenso reine Extrakte erhält. Jeder Extrakt wird nach dem Neutralisieren durch Kohlensäure mit  $\frac{2}{10}$  seines Volumens 96%igen Alkohols versetzt. Der Niederschlag erhält schleimartige Begleitstoffe; die Peroxydase bleibt in Lösung. Die alkoholischen Bariumhydroxydauszüge bleiben über Nacht im Eisschrank stehen, werden dann dekantiert und filtriert. Die Filtrate werden bei einer Temperatur von nicht über  $30^{\circ}$  auf je etwa 70 ccm im Vakuum eingengt, nochmals vom ausgefallenen Bariumcarbonat abgetrennt und dann mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols unter Umrühren gefällt, wobei sich ein feiner Niederschlag bildet, der nach kurzem Verweilen von der überstehenden und wenig enzymreichen Flüssigkeit durch Filtration oder durch Zentrifugieren getrennt wird. Die auf diese Weise gewonnenen Produkte werden beim Anreiben mit wenig Alkohol pulvrig und können getrocknet werden. Dieses Rohprodukt kann eine Purpurogallinzahl von 100—500 haben.

**Reinigung der Peroxydase durch Adsorption.** Durch Fällung mit Quecksilberchlorid läßt sich der Reinheitsgrad des Rohproduktes auf etwa das fünffache steigern; doch ist dieser Weg nicht ohne Schwierigkeiten<sup>1</sup>.

Am besten läßt sich die weitere Reinigung aber durch Adsorption durchführen. WILLSTÄTTER<sup>2</sup> gibt dafür folgendes Beispiel:

2 g Rohprodukt (604 Peroxydaseeinheiten von der P. Z. 302) werden in 365 ccm 50%igen Alkohol gelöst. Die Peroxydaselösung wird mit Aluminiumhydroxyd A, das in kleinen Anteilen eingetragen wird, behandelt. Die Menge des hinzuzufügenden Aluminiumhydroxyds richtet sich nach der Zahl der Peroxydaseeinheiten in der Lösung. In dem angeführten Beispiel wurden 70 ccm Tonerdesuspension (= 4,1 g  $Al_2O_3$ ) verbraucht. Gegen Ende der Behandlung prüft man auf Vollständigkeit der Adsorption, indem man eine kleine Probe entnimmt, den Niederschlag abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit mittels Pyrogallols und Wasserstoffsperoxyds auf ihren Peroxydasegehalt untersucht. Die Restlösung soll nur noch Spuren von Peroxydase enthalten. Dann setzt man die der Aluminiumhydroxydaufschlammung entsprechende Menge Alkohol hinzu. Das Adsorbat wird in der Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt, hierauf mit eiskaltem Wasser angerührt und mit 400 ccm Wasser in eine weithalsige Flasche gespült, in die man nun unter starkem Schütteln  $\frac{1}{4}$  Stunde Kohlensäure einleitet. Das Ferment wird leicht eluiert. Die vom Adsorbens abgetrennte Elution ist rötlich und enthält fast alles angewandte Enzym. Sie wird bei  $10$ — $15^{\circ}$  Destillationstemperatur im Jenaer Glaskolben auf etwa 170 ccm eingengt (P.-Z. = 845).

Das Enzym wird nun zum zweitenmal aus 50%igen Alkohol mit 2,35 g  $Al_2O_3$  adsorbiert und wie im ersten Fall eluiert. Ausbeute 629 Peroxydaseeinheiten mit der P.-Zahl 1270.

**Adsorption mit Kaolin.** Die Elution bringt man durch Verdünnen auf  $\frac{1}{2}$  Liter und Verdünnen mit dem gleichen Volumen Alkohol auf einen Gehalt von 0,05% an Trockengewicht und trägt in kleinen Anteilen 22 g Kaolin ein. Das Adsorbens nimmt die Peroxydase vollkommen auf; es wird in der Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt, mit 400 ccm Wasser verrührt und dann mit soviel n-Ammoniak versetzt, daß die Lösung 0,1%ig wird. Die Elutionsflüssigkeit wird sofort abgetrennt und mit Essigsäure neutralisiert. Die Elution mit verdünntem Ammoniak wird wiederholt. Die Ausbeute beträgt etwa 60%.

**Dritte Tonerdeadsorption.** Die auf 95 ccm eingengte Kaolinelution (328 Peroxydaseeinheiten) geben beim Adsorbieren mit 2,65 g  $Al_2O_3$  und Eluieren mit kohlenensäurehaltigem Wasser 275 ccm Peroxydaselösung mit 322 Peroxydaseeinheiten von der Purpurogallinzahl 2260. Eine weitere Adsorption mit Tonerde führt zu großen Verlusten und zu unreineren Präparaten.

Solche hochgereinigten Präparate lassen sich aber durch Fällung mit Tannin in ihrem Reinheitsgrad noch steigern.

**Tanninfällung.** 29 ccm Enzymlösung mit 59 Peroxydaseeinheiten werden mit 1%iger Tanninlösung in kleinen Anteilen bis zur Vollständigkeit gefällt. Die Tanninfällung wird abzentrifugiert, in 100 ccm Wasser suspendiert, mit 2 ccm n-Essigsäure angesäuert und durch Zusatz von 25 ccm Alkohol zur vollständigen Lösung gebracht. Die Lösung wird

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER: Ann. Chem. 1921, 422, 47.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. POLLINGER: Ann. Chem. 1923, 430, 269.



noch weiter verdünnt und mit 3 g Kaolin die Peroxydase entfernt. Das Adsorbat läßt sich glatt mit 0,1% Ammoniak zerlegen.

Da die aus Kaolin eluierten Enzymlösungen meist zu hohen Aschegehalt aufweisen, unterwirft man zweckmäßig die Peroxydase einer vierten Adsorption aus 50%igem Alkohol mit Aluminiumhydroxyd (erforderlich 0,59 g  $Al_2O_3$ ). Die neue Elution enthält in 225 ccm noch 28,2 Peroxydaseeinheiten. Sie wird eingengt und mit Alkohol gefällt. Die Fällung hat eine Purpurogallinzahl von 3070.

### γ) Eigenschaften der Peroxydase.

Hochgereinigte Peroxydasepräparate zeigen nach WILLSTÄTTER<sup>1</sup> keine Reaktion auf Eiweiß und Kohlenhydrate.

Die Peroxydase besitzt in Lösung eine schöne, hellrote Farbe. Peroxydase-lösungen aus Meerrettich zeigen nach KUHN und Mitarbeitern<sup>2</sup> nach Reduktion der Enzymlösung in Gegenwart von etwas verdünnter Natronlauge und Pyridin mit Natriumhydrosulfit das Hämochromogenspektrum von reduziertem Häm. Die lichtelektrische Photometrie ergibt annähernde Proportionalität zwischen Wirksamkeit und Höhe der Adsorptionsbanden bei 420 m $\mu$ . Demnach ist es sehr wahrscheinlich, daß die aktive Gruppe der Peroxydase, ähnlich wie die der Katalase, eine Eisenporphyrinverbindung ist. Der spektrophotometrisch berechnete Gehalt an „Hämeneisen“ ist äußerst gering. Er beträgt für das beste Präparat 0,009%. Für ein Präparat der Purpurogallinzahl 3400 berechnet sich ein Hämehalt von 0,10%.

<sup>1</sup> R. WILLSTÄTTER u. A. POLLINGER: Ann. Chem. 1923, 430, 269.

<sup>2</sup> R. KUHN, D. B. HAND u. M. FLOKIN: Naturwiss. 1931, 19, 771; Zeitschr. physiol. Chem. 1931, 201, 255.

### Buch-Literatur.

E. ABDERHALDEN: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Berlin u. Wien. — E. BUCHNER: Die Zymesegärung. München 1903. — H. v. EULER: Chemie der Enzyme. München 1928. Biokatalysatoren. Stuttgart 1930. — A. FODOR: Das Fermentproblem. Dresden u. Leipzig 1929. — W. GRASSMANN: Neue Methoden und Ergebnisse der Enzymforschung. München 1929. — J. B. S. HALDANE u. K. STERN: Allgemeine Chemie der Enzyme. Dresden u. Leipzig 1932. — L. MICHAELIS: Praktikum der physikalischen Chemie. Berlin 1926. Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1922. Oxydations-Reduktionspotentiale. Berlin 1929. — C. OPPENHEIMER: Die Technologie der Fermente. Leipzig 1929. — C. OPPENHEIMER u. R. KUHN: Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1925. — C. OPPENHEIMER u. W. PINCUSSEN: Methodik der Fermente. Leipzig 1929. — E. WALDSCHMITT-LEITZ: Enzyme. Braunschweig 1924. — O. WARBURG: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin 1928. — R. WILLSTÄTTER: Untersuchungen über Enzyme, 2 Bände. Berlin 1927.

# Fett.

Von

Professor DR. A. BÖMER-Münster i. W.

Mit 5 Abbildungen.

Unter „Fett“<sup>1</sup> versteht man bei der Analyse der Lebensmittel den Ätherauszug<sup>2</sup> der wasserfreien Substanz, d. h. alle Stoffe, welche aus dieser durch wasserfreien Äthyläther ausziehbar und bei einstündigem Trocknen im Wasserdampftrockenschranke nicht flüchtig sind.

Außer den Glyceriden der Fettsäuren (und den freien Fettsäuren) enthält das auf diese Weise gewonnene „Fett“ häufig noch mehr oder weniger fettähnliche Stoffe (Lipoide), wie Sterine und deren Ester, Phosphatide, Wachse, ferner Kohlenwasserstoffe, Ätherische Öle, Alkaloide, Farbstoffe, organische Säuren usw. Bei solchen Ätherauszügen, welche größere Mengen dieser Stoffe (Nebenbestandteile) enthalten, wählt man an Stelle der Bezeichnung „Fett“ auch vielfach die Bezeichnungen „Rohfett“, „Ätherlösliche Stoffe“, „Ätherauszug“ oder „Ätherextrakt“.

Will man die Nebenbestandteile des Ätherauszuges entfernen bzw. ein möglichst reines Fett gewinnen, so verwendet man entweder zur Ausziehung der Substanz von vornherein Petroläther<sup>3</sup> (Siedepunkt 45—55°) oder man nimmt den Ätherauszug mit Petroläther auf und bestimmt die darin löslichen Stoffe nach einstündigem Trocknen im Wasserdampftrockenschranke. Die auf diese Weise gewonnenen Stoffe (gereinigtes Fett) bezeichnet man am besten als „Petrolätherextrakt“.

Ätherische Öle kann man durch Destillation mit Wasserdampf aus dem Fett entfernen, Farbstoffe (Chlorophyll) lassen sich durch Behandeln des Ätherauszuges mit gereinigter und getrockneter Tierkohle entfernen; diese absorbiert aber auch einen Teil des eigentlichen Fettes.

Über die Bestimmung der freien Fettsäuren, der Lipoide und sonstigen Nebenbestandteile des Äther- oder Petrolätherextraktes siehe Band IV.

## I. Nachweis des Fettes.

Fett ist gekennzeichnet durch seine ölige, schmalz- oder talgartige Konsistenz, seine Schlüpfrigkeit zwischen den Fingern und auf der Zunge. Das Fett besitzt meist keinen ausgesprochenen Geruch und Geschmack. Infolge des leichten Einziehens in trockene poröse Körper, insbesondere in Fasergewebe, erzeugen Öl und geschmolzenes Fett auf Papier einen Fettfleck, der mit Wasser und durch Erwärmen nicht entfernbar ist.

<sup>1</sup> Unter der allgemeinen Bezeichnung „Fett“ sind in den nachfolgenden Abschnitten nicht nur die bei Zimmertemperatur festen (eigentlichen) Fette, sondern auch die flüssigen fetten Öle verstanden.

<sup>2</sup> Zum „Fett“ gehören daher die Lipoide (Phosphatide usw.) nur insoweit, als sie durch den Äther ausgezogen werden. Vgl. dazu B. REWALD (Chem.-Ztg. 1928, 52, 1013), H. FINCKE (Chem.-Ztg. 1930, 54, 598), R. ROSENBUSCH (Chem.-Ztg. 1930, 54, 965).

<sup>3</sup> Die Deutschen Einheitsmethoden 1930 (WIZÖFF) bestimmen den Fettgehalt der Ölsamen nur durch Ausziehen mit Petroläther, der zwischen 45 und 55° siedet und bei 60° keinen Rückstand hinterläßt. Der „Petrolätherextrakt“ wird 1 Stunde im Vakuum bei 60—70° getrocknet.

Fett besitzt ein niedriges Spez. Gewicht (0,91—0,97) und schwimmt daher auf Wasser. In diesem sowie in kaltem Alkohol, Eisessig und Chloralhydrat ist es unlöslich; dagegen ist es leicht löslich in Petrol- und Äthyläther, Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und den anderen sog. Fettlösungsmitteln.

Fett ist durch Alkalien verseifbar und entwickelt beim Erhitzen auf höhere Temperatur, insbesondere im Gemisch mit Kaliumbisulfat, Acrolein. Sehr empfindlich ist die Campherprobe. Über die Ausführung dieser Nachweismethoden sowie über den mikrochemischen Nachweis des Fettes in Pflanzen- und Tiergeweben siehe Band IV.

## II. Bestimmung des Fettes.

Die Fettbestimmungsmethoden kann man in folgende beiden Gruppen einteilen:

Erste Gruppe: Eine bestimmte Menge Substanz wird durch eine oft wiederholte Ausziehung mit dem Fettlösungsmittel so weit erschöpft, bis die zurückbleibende Fettmenge nur noch so klein ist, daß sie praktisch vernachlässigt werden kann. Hierbei ist weder ein bestimmtes Volumen des Lösungsmittels noch der Fettlösung von erheblicher Bedeutung, weil die schließlich entstehende Lösung nach Verdampfung des Lösungsmittels die Gesamtmenge des gelösten Stoffes hinterläßt (Verfahren nach SOXHLET).

Zweite Gruppe: Diese Gruppe umfaßt die Verfahren, welche mit einem bestimmten Volumen des Fettlösungsmittels arbeiten. Eine bestimmte Menge Substanz wird mit einem bestimmten Volumen des Lösungsmittels behandelt — wobei dafür Sorge zu tragen ist, daß das Volumen des Lösungsmittels unverändert bleibt —, und dann wird entweder in einem bestimmten Teile der Fettlösung der Fettgehalt durch Verdunstung des Lösungsmittels festgestellt (Verfahren nach M. MONHAUPT und J. GROSSFELD) oder es werden das Spezifische Gewicht oder die Lichtbrechung der Fettlösung bestimmt und daraus der Fettgehalt der Lösung ermittelt. M. MONHAUPT<sup>1</sup> verwendet bei seinem Verfahren Petroläther als Lösungsmittel, während J. GROSSFELD<sup>2</sup> Trichloräthylen verwendet; letzteres Verfahren ist wegen der geringeren Flüchtigkeit des Trichloräthylens und wegen der allgemeineren Anwendbarkeit vorzuziehen.

### 1. Fettbestimmung nach FR. SOXHLET.

a) In pulverförmigen Stoffen: 5 oder 10 g der nötigenfalls gemahlener oder gut gepulverten Substanz werden in eine unten geschlossene fertige Papierhülse (1) oder in eine aus fettfreiem Fließpapier hergestellte Hülse (2) gebracht. Hat man die Substanz eingefüllt, so schließt man bei Hülsen letzterer Art die obere Öffnung durch Umbiegen oder bei festen Hülsen dadurch, daß man entfettete Baumwolle in sie schiebt und damit die Substanz vollständig bedeckt.

Die mit der Substanz beschickte Hülse wird 2—3 Stunden im Wasserdampftrockenschranke bei 95—100° getrocknet (3), dann in einen Extraktionsapparat (4) gebracht und bis zur Erschöpfung — in der Regel genügen 4—6 Stunden (5) — mit wasserfreiem Äther ausgezogen. Nachdem dies geschehen ist, wird der Äther von der ätherischen Fettlösung abdestilliert (6), der Fettrückstand im Kölbchen 1 Stunde lang im Wasserdampftrockenschranke getrocknet und nach dem Abkühlen des Kölbchens im Exsiccator zur Wägung gebracht.

Bemerkungen zu vorstehendem Verfahren: 1. Für die Fettbestimmung geeignete fertige Papierhülsen liefert die Firma C. Schleicher & Schüll in Düren (Rhld.). Von W. BERSCH<sup>3</sup> und anderen werden zu dem gleichen Zwecke Aluminiumhülsen mit siebartig durchlöcherter Boden empfohlen; diese können von der Firma W. J. Rohrbecks Nachfolger, Wien I, Kärntnerstr. 59, bezogen werden.

<sup>1</sup> M. MONHAUPT: Chem.-Ztg. 1911, 35, 1305; 1922, 46, 881. — Z. 1923, 45, 120.

<sup>2</sup> J. GROSSFELD: Z. 1922, 44, 193; 1923, 45, 147; 46, 63; 1925, 49, 287. — Chem.-Ztg. 1927, 51, 617.

<sup>3</sup> W. BERSCH: Zeitschr. landw. Versuchswesen in Österreich 1901, 4, 31.

2. Die Hülsen aus Fließpapier werden in der Weise hergestellt, daß man um ein zylindrisches Holzstück, dessen Durchmesser 4—5 mm geringer ist als die lichte Weite des Extraktionszylinders, ein Stück Filtrierpapier zweimal herumrollt, über die ebene Basis des Holzzyinders ein seinem Durchmesser entsprechendes Stück der gebildeten Rolle hervorsteht läßt, dieses ähnlich, wie man ein Paket schließt, umbiegt und den gebildeten Boden der Hülse durch kräftiges Aufdrücken auf den Tisch ebnet.

3. Das Vortrocknen der Substanz darf nicht zu lange und nicht bei zu hoher Temperatur erfolgen, weil sonst unter Umständen, namentlich bei Stoffen, welche, wie Leinsamen, Mohnsamen u. dgl., trocknende Öle enthalten, Veränderungen des Fettes eintreten können. Um solche zu vermeiden, kann die Entfernung des Wassers auch durch einständiges Trocknen im Leuchtgas- oder Wasserstoffstrom bei 100° erfolgen. O. FÖRSTER<sup>1</sup> hat mehrere Einrichtungen für diese Art der Trocknung beschrieben. Statt die Substanz zu trocknen, kann man sie auch mit wasserfreiem Natriumsulfat verreiben.

4. α) Für die Extraktion des Fettes sind die mannigfachen Apparate vorgeschlagen worden, die hier nicht alle beschrieben werden können<sup>2</sup>. Am meisten im Gebrauch ist noch immer der Extraktionsapparat von FR. SOXHLET (Abb. 1), der sowohl aus Glas als auch aus Messing hergestellt wird und folgende Einrichtung besitzt:

*A* ist ein geschlossener 35 mm weiter, 150 mm hoher Glaszylinder, an dessen Boden das 13—15 mm weite, 100 mm lange Rohr *B* angeschmolzen ist. *A* und *B* sind durch das 8—9 mm weite Rohr *C* verbunden. Der aus einer dickwandigen, aber nur 2—3 mm im Lichten weiten Röhre gefertigte Heber *D* ist an der tiefsten Stelle am Boden von *A* angeschmolzen bzw. angelötet, biegt sich an der Außenwand von *A* nach aufwärts und geht, immer der äußeren Zylinderwand anliegend, nach abwärts und durch *B* hindurch. Das Rohr *B* wird mittels eines Korkes mit einem etwa 100 ccm fassenden weithalsigen Kölbchen und *A* mit einem Rückflußkühler verbunden.

Der obere Rand der ausziehenden Hülse muß wenigstens 3 mm unter dem höchsten Punkte der Heberkrümmung liegen, da anderenfalls der Filtrerrand Fett zurückhält. Des weiteren ist notwendig zu beachten, daß die Hülse nicht mit Baumwolle vollgefüllt wird, und daß der aus dem Kühler zurücktropfende Äther immer in die Hülse eintropft. Man verbindet schließlich ein gewogenes weithalsiges Kölbchen von etwa 100 ccm Fassungsraum mit dem Apparat, nachdem man in das Kölbchen etwa 25 ccm wasserfreien Äther und in den Extraktionszylinder so viel Äther eingegossen hat, daß dieser durch den Heber überfließt, und stellt das Kölbchen in Wasser oder auf eine Heizfläche, welche auf 60—70° erhalten werden (vgl. unten unter 5.). Der Äther destilliert nun durch *B*, *C* und den oberen Teil von *A* in den auf diesen aufgesetzten Kühler, wird hier kondensiert und tropft dann auf die in *A* befindliche Hülse mit der zu extrahierenden Substanz, die er durchtränkt und schließlich überschichtet. Sobald das Niveau des überdestillierten Äthers die höchste Stelle *h* der Heberkrümmung etwas überschritten hat, fängt der Heber an zu wirken und saugt die Ätherfettlösung zuerst in vollem, dann in durch Luftblasen unterbrochenem Strahle ab. Das Aufwärtsdestillieren wird hierdurch nicht unterbrochen; doch filtriert die in der Hülse sich neuerdings sammelnde Äthermenge, der Heberwirkung entsprechend, nicht rasch genug nach; infolgedessen entleert sich der Heber und es erfolgt eine abermalige Ansammlung von Äther bis zur Höhe *h*.

C. v. D. HEIDE<sup>3</sup> hat den SOXHLET'Schen Extraktionsapparat dahin abgeändert, daß er die Ausziehung auch beim Siedepunkt des Ausziehungsmittels gestattet, welche Einrichtung

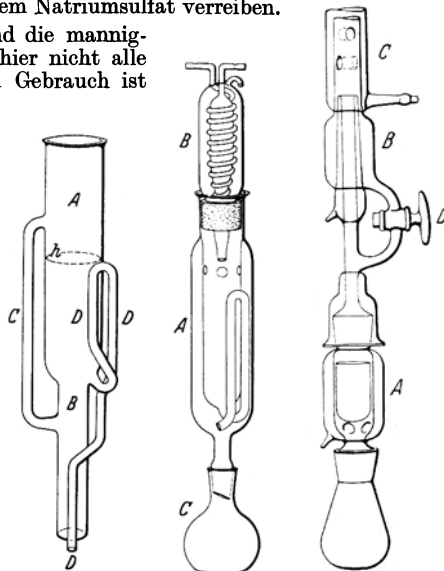


Abb. 1.  
Extraktions-  
apparat nach  
FR. SOXHLET.

Abb. 2.  
Extraktions-  
apparat nach  
C. v. D. HEIDE.

Abb. 3.  
Extraktions-  
apparat nach  
TWSSELMANN.

<sup>1</sup> O. FÖRSTER: Landw. Vers.-Stationen 1890, 37, 57.

<sup>2</sup> Eine Reihe von Extraktionsapparaten für verschiedene Zwecke ist neuerdings von K. PETERS (Chem. Fabrik 1934, 21—25) beschrieben worden, wobei auch die ältere Literatur aufgeführt ist.

<sup>3</sup> C. v. D. HEIDE: Z. 1909, 17, 315.

in manchen Fällen zweckmäßig sein mag<sup>1</sup>. In den Hauptteil *A* (Abb. 2) wird die Schleicher & Schüllsche Papierhülse, gefüllt mit der zu extrahierenden Substanz, eingebracht, der Kühler (*B*) aufgesetzt, das Siedegefaß (*C*) mit Äther gefüllt und die Erhitzung begonnen. Zur Abhaltung von Feuchtigkeit kann an den Kühler ein Chlorcalciumrohr angesetzt werden. Der Vorzug dieses Apparates besteht hauptsächlich in der Ersetzung des Kugelhühlers oder LIEBIG'schen Rückflußkühlers durch den aufgeschliffenen, kompendiösen Schlangenkühler.

In der Technik wird vielfach der Extraktionsapparat von TWISSELMANN<sup>2</sup> (Abb. 3) verwendet, dessen Vorzüge vorwiegend darin bestehen, daß die Substanz in der Papierhülse *A* beim Siedepunkt des Extraktionsmittels ausgezogen wird und infolge Anbringung eines Äthersammelraums *B* an dem Kühler *C* nach beendeter Extraktion nach Schließung des Absperrhahnes *D* der Äther in *B* gesammelt und darauf nach Öffnung des Hahnes *D* die Extraktion einer neuen Substanz vorgenommen werden kann.

Sehr einfach ist die in Abb. 4 dargestellte Durchtropf-Extraktionsapparat<sup>3</sup>. In dem Extraktionsapparat (*I*) ruhen Extraktionshülse, GOOCH-Tiegel usw., die natürlich nicht den ganzen Durchmesser ausfüllen dürfen, auf 4 Glasspitzen (*B*); der Destillationsapparat (*II*) hat ein Außenrohr (*D*) für die aufsteigenden Lösungsmitteldämpfe und eine Glasplatte (*C*), auf der sich das Lösungsmittel ansammelt. *A* ist bei beiden Apparaten ein Einhängenkühler aus Kupfer. Für die Aufnahme des Fettes dient ein 100 ccm-Weithals-ERLENMEYER-Kolben (Nr. 14a) von Schott & Genossen. Zur Erhitzung dient eine regulierbare elektrische Heizplatte von W. C. Heraeus-Hanau.

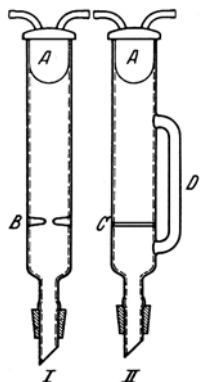


Abb. 4.  
Einfache Durchtropfapparat.  
*I* Apparat zur Extraktion; *II* Apparat zum Abdestillieren des Lösungsmittels.

β) Vielfach wird empfohlen, die Kölbchen zur Aufnahme des Lösungsmittels bzw. des Fettes mittels Glasschliffes mit dem Extraktionskörper und diesen auch in derselben Weise oder mittels Korkstopfens mit dem Kühler zu verbinden, weil Gummischlauchverbindungen durch den Äther mehr oder minder angegriffen werden. Wählt man diese jedoch so kurz wie möglich und den Schlauch möglichst eng, so daß kein Äther zwischen die innere Schlauchwand und die äußere Glaswand der Röhren dringen kann, so sind nach diesseitigen Erfahrungen die Gummischlauchverbindungen mit dem Kühler sehr haltbar und werden auch durch sie nennenswerte Fehler nicht bedingt.

γ) Für die gleichzeitige Ausführung von mehreren Fettbestimmungen sind die verschiedensten Einrichtungen empfohlen worden, auf die hier nicht eingegangen werden kann. Vielfach werden die verschiedenen Extraktionsapparate in einem gemeinsamen Wasserbade erwärmt. Diese Anordnung birgt die Gefahr, daß beim Zerspringen eines Kölbchens oder eines Extraktionskörpers leicht eine Entzündung des Äthers eintritt und dadurch auch leicht die übrigen Apparate beschädigt werden; aus diesem Grunde müssen

solche Apparate stets unter Aufsicht stehen. Weit gefahrloser sind dagegen die Anordnungen, bei denen zur Erwärmung des Extraktionsmittels Wasserdampfleitung oder elektrisch geheizte Platten zur Verfügung stehen.

δ) Zu den Korkverbindungen dürfen nur beste, möglichst porenfreie Korkstopfen verwendet werden, die vor dem Gebrauch durch Ausziehen mit Äther oder Benzol von äther- bzw. benzollöslichen Verbindungen befreit sind.

5. In 4—6 Stunden ist jedenfalls alles Fett ausgezogen; dagegen sind in dieser Zeit z. B. die in Äther schwer löslichen Alkaloide (z. B. Theobromin bei Kakao) meist noch nicht vollkommen ausgezogen.

Ist die Hülse mit der auszuziehenden Substanz sehr kurz, so daß sie den Raum bis zur höchsten Stelle des Hebbers (*h* in Abb. 1) nur zum Teil füllt, so kann man die Ausziehung des Fettes dadurch beschleunigen, daß man den über der Hülse befindlichen Raum mit Glasperlen oder zweckmäßiger mit einem passenden hohlen Glaskörper ausfüllt, wodurch ein öfteres Abhebern des Extraktionsmittels bedingt wird. Ist dagegen die an beiden Seiten verschlossene Hülse mit der Substanz sehr lang, so daß sie über die höchste Stelle des Hebbers hinausragt, so dreht man sie nach etwa 2 Stunden herum, so daß der bis dahin herausragende Teil der Hülse nunmehr nach unten zu liegen kommt.

<sup>1</sup> Der Apparat wird von C. Gerhardt in Bonn geliefert.

<sup>2</sup> TWISSELMANN: Chem.-Ztg. 1923, 47, 506. Der Apparat wird von der Firma A. Dargatz in Hamburg 1, Pferdemarkt 66, geliefert.

<sup>3</sup> Beide Apparate werden von der Firma W. K. Heinz in Stützerbach (Thür.) hergestellt. Die Apparatur hat sich in den Laboratorien der van den Bergh'schen Margarine-Gesellschaft in Cleve bestens bewährt.

6. Das Abdestillieren des Äthers kann man am einfachsten in dem Extraktionsapparate selbst vornehmen, indem man bei den Apparaten Abb. 1 und 2 die Hülse mit der extrahierten Substanz aus dem Apparate herausnimmt, darauf den Äther in dem bis dahin von der Hülse eingenommenen Raume sich ansammeln läßt und ihn nach dem Abnehmen des Apparates von dem Kühler durch die obere Öffnung des Apparates abgießt.

b) In Flüssigkeiten: Sollen das Fett bzw. die ätherlöslichen Stoffe in Flüssigkeiten (Milch, Eigelb usw.) bestimmt werden, so müssen diese zunächst mit Hilfe eines Aufsaugungs- oder Verteilungsmittels zur Trockne verdampft, dann zerkleinert und darauf vollkommen getrocknet werden. Derartige Aufsaugungs- und Verteilungsmittel sind Fließpapier, entfettete Watte, Asbest, Bimsstein, Sand und Gips (10 + 1), usw., ferner wasserfreies Natriumsulfat. Man nimmt die Eindampfung zweckmäßig in einem HOFMEISTERSCHEN Glascälchen vor, zerkleinert die unter öfterem Umrühren eingetrocknete Masse mitsamt dem Glascälchen, füllt das Pulver in eine Extraktionshülse und verfährt im übrigen in der oben unter a) angegebenen Weise.

c) Verfahren von J. C. BERNTRÖP<sup>1</sup>: Nach U. WEIDMANN und A. METZGER<sup>2</sup> erhält man bei manchen Stoffen (Abfällen der Stärke-, Spiritus- und Zuckerindustrie, Fleischmehl, Fischmehl und anderen Futtermitteln) bis zu 2,7% höhere Fettwerte, wenn man 5 g Substanz vor der Extraktion mit 100 ccm 10%iger Salzsäure 1 Stunde kocht und den abfiltrierten und dann getrockneten Rückstand im SOXHLET-Apparat mit Äther auszieht. M. WEIBULL<sup>3</sup> und BERNTRÖP haben ähnliche Ergebnisse bei der Fettbestimmung in Brot erhalten.

d) Bei sehr fettreichen Stoffen (Kakao usw.) empfehlen BORDAS und F. TOUPLAIN<sup>4</sup> sowie auch H. KREIS<sup>5</sup>, die Substanz (2—3 g) mit Äther zu schütteln, die Flüssigkeit zu zentrifugieren, die ätherische Fettlösung abzugießen, diese Behandlung dreimal zu wiederholen, die Fettlösung einzudampfen und den Rückstand zu wägen.

## 2. Fettbestimmung nach J. GROSSFELD.

Das Verfahren eignet sich namentlich zur Fettbestimmung in fettreichen Stoffen (wie Butter, Seifen, Fleisch, Kakao usw.) und ist schnell und mit geringen Unkosten ausführbar<sup>6</sup>. Es beruht darauf, daß man die auf Fettgehalt zu untersuchende Substanz mit einer gewissen Menge Wasser oder konz. Salzsäure und einem bestimmten Volumen des im Wasser vollständig unlöslichen Fettlösungsmittels in innige Mischung bringt, wodurch sich das Fett vollständig in dem Lösungsmittel löst, und daß man in einer bestimmten Menge der Lösung den Fettgehalt gewichtsmäßig durch Verdampfen des Lösungsmittels feststellt. Das Verfahren liefert nur dann genaue Ergebnisse, wenn dafür Sorge getragen wird, daß keine größeren Verluste an Lösungsmittel durch Verdunsten eintreten.

Ist  $x$  die gesuchte Fettmenge in Gramm,  $m$  die Gewichtsmenge des Fettlösungsmittels,  $t$  das Gewicht der zur Bestimmung der Trockensubstanz ( $a$ ) verwendeten Fettlösung, so ist

$$x : a = (x + m) : t \quad \text{oder} \quad x = \frac{am}{t - a} \quad (\text{I})$$

<sup>1</sup> J. C. BERNTRÖP: Zeitschr. angew. Chem. 1902, 121.

<sup>2</sup> U. WEIDMANN u. A. METZGER: Chem.-Ztg. 1933, 57, 363.

<sup>3</sup> M. WEIBULL: Zeitschr. angew. Chem. 1892, 450; 1894, 199.

<sup>4</sup> BORDAS u. F. TOUPLAIN: Ann. Falsif. 1908, 1, 12; C. 1909, II, 755.

<sup>5</sup> H. KREIS: Schweiz. Mitt. Lebensm.-Unters. 1916, 7, 315.

<sup>6</sup> Das Verfahren wird von W. SUTTHOFF und G. VELTMANN (Z. 1924, 47, 146), H. DUMARTHÉRAY (Schweiz. Mitt. Lebensm.-Unters. 1924, 15, 72), W. KERP und G. RLESS (Z. 1925, 49, 245), W. STURM (Chem. Weekbl. 1925, 22, 167) u. a. sehr günstig beurteilt.

oder, wenn 100 g Fettlösungsmittel angewendet und 25 g Fettlösung zur Trockne verdampft worden sind, so ist

$$x = \frac{100 a}{25 - a}. \quad (\text{II})$$

Bezieht man ferner alle Mengen auf Volumen und bezeichnet das Volumen der zu bestimmenden Fettmenge als  $x_1$ , das des verwendeten Lösungsmittels als  $v$ , die abpipettierte Menge der Fettlösung als  $p$  und die gefundene Fettmenge als  $a_1$  — sämtliche Werte in Kubikzentimetern ausgedrückt —, so ist entsprechend den Gleichungen I:

$$x_1 : a_1 = (x_1 + v) : p \quad \text{oder} \quad x_1 = \frac{a_1 \cdot v}{p - a}$$

und da das Volumen des Fettes gleich dem Gewicht, dividiert durch das Spez. Gewicht ( $d$ ) ist, so ist:

$$\frac{x}{d} = \frac{\frac{a}{d} \cdot v}{p - \frac{a}{d}} \quad \text{oder} \quad x = \frac{a v}{p - \frac{a}{d}}$$

und bei Annahme der obigen Zahlen 100 bzw. 25 ccm:

$$x = \frac{100 a}{25 - \frac{a}{d}} = \frac{100 a d}{25 d - a} \quad \text{oder, wenn } d = 1 \text{ ist, } x = \frac{100 a}{25 - a}.$$

Es ist also  $x$  eine Funktion von  $a$  und  $d$ ; davon wird  $a$  direkt bestimmt, während  $d$  von 0,90—1,00 schwanken kann. Berücksichtigt man das verschiedene Spezifische Gewicht nicht, so beträgt der höchstmögliche Fehler 1,1%, während er bei einem Fettgehalte unter 42%, im Höchstfalle weniger als 0,19% beträgt; bei höheren Fettgehalten kann man folgende Werte für  $d$  nach J. LUND<sup>1</sup> einsetzen:

|                    |                      |                    |                       |              |      |
|--------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------|------|
| Butterfett .. 0,92 | Margarinefett . 0,92 | Cocosfett ... 0,92 | Sesamöl .....         | 0,92         |      |
| Rindsfett ... 0,91 | Tran .....           | 0,92               | Kakaofett .. 0,91     | Rüböl.....   | 0,91 |
| Schweinefett 0,91  | Palmfett .....       | 0,91               | Olivenöl ... 0,92     | Leinöl ..... | 0,93 |
| Pferdefett .. 0,91 | Palmkernfett.. 0,92  | Erdnußöl ... 0,92  | Fettsäuren aus Seifen | 0,90         |      |

Als Fettlösungsmittel eignet sich besonders gut das Trichloräthylen<sup>2</sup>; es hat die Dichte 1,47, siedet bei 88° und verdampft trotzdem infolge seiner geringen Verdampfungswärme auf dem Wasserbade sehr leicht und brennt nicht; es löst Fette jeder Art sehr gut, ist aber seinerseits in Wasser praktisch unlöslich<sup>3</sup>.

Auch Tetrachlorkohlenstoff eignet sich zur Extraktion, doch zersetzt er sich leichter unter Salzsäureabscheidung als Trichloräthylen. Leichtflüchtige Fettlösungsmittel, wie Äther und Petroläther sind für das Verfahren nicht geeignet; sie ergeben infolge Verdunstungsverluste des Lösungsmittelvolumens leicht zu hohe Fettgehalte<sup>4</sup>.

Ausführung des Verfahrens: 5—10 g Substanz werden in einem weit- und kurzhalsigen 300 ccm-Rundkolben mit genau 100 ccm Trichloräthylen von Zimmertemperatur mit dichtschließend aufgesetztem<sup>5</sup>, gut wirkendem

<sup>1</sup> J. LUND: Z. 1922, 44, 113. Die Werte beziehen sich auch bei den festen Fetten auf den flüssigen Zustand, in dem sie in den Lösungen vorhanden sind.

<sup>2</sup> Trichloräthylen ist von der Firma Dr. Alexander Wacker, Gesellschaft für elektrochemische Industrie G. m. b. H., in München zu beziehen. Für die Fettbestimmungen genügt das technische Präparat, sofern es nur unter 100° vollkommen flüchtig ist. — Trichloräthylen ist vor Licht geschützt aufzubewahren, da es sich im Lichte unter Abspaltung von Salzsäure zersetzt.

<sup>3</sup> 100 ccm Wasser lösen nur 0,08 g = 0,05 ccm Trichloräthylen.

<sup>4</sup> E. VAUTIER: Schweiz. Mitt. Lebensm.-Unters. 1919, 10, 40.

<sup>5</sup> Am besten verwendet man zum Aufsetzen des Kühlers Gummistopfen, die in den 5—10 Minuten des Erwärms durch das Trichloräthylen nicht wesentlich angegriffen werden. Die 100 g Trichloräthylen dürfen durch 5 Minuten langes Kochen nicht mehr als 0,5 g Gewichtsverlust erfahren.

Rückflußkühler<sup>1</sup> nach Zusatz von etwas Bimssteinpulver 5—10 Minuten lang lebhaft gekocht.

Bei Stoffen, wie Butter, Margarine usw., bei denen das Fett nicht in Zellen eingeschlossen ist, ferner auch bei sehr feinen Pulvern, wie Getreidemehlen, Kakao usw. ist ein Erhitzen nicht erforderlich, sondern genügt ein Umschwenken im Kolben. Dagegen ist bei Fleisch, Käse usw., bei denen das Lösungsmittel nur schwer in das Innere eindringt, die Substanz vor dem Zusatz des Trichloräthylens mit 20 ccm konz. Salzsäure auf freier Flamme zu erhitzen, bis die Proteine sich gelöst haben<sup>2</sup>.

Ursprünglich wurde die erkaltete Fettlösung aus einem Scheidetrichter<sup>3</sup> durch ein bedeckt zu haltendes trockenes Filter filtriert und von dem klaren<sup>4</sup> Filtrat wurden 25 ccm<sup>5</sup> in einem Glasschälchen auf dem Wasserbade<sup>6</sup> verdunstet und der Rückstand 1 Stunde im Trockenschranke bei 105—110° getrocknet. Beträgt die so gefundene Fettmenge  $a$  g, so ergibt sich der prozentuale Fettgehalt ( $x$ ) der Substanz nach der Gleichung:

$$x = \frac{100}{20} \cdot \frac{100 a}{25 - \frac{a}{0,92}} = \frac{10000 a}{500 - \frac{20 a}{0,92}} = \frac{500 a}{25 - \frac{a}{0,92}},$$

wenn 0,92 das Spezifische Gewicht des Fettes ist.

Weicht das Spezifische Gewicht des in Frage kommenden Fettes wesentlich von 0,92 ab (vgl. die obige Tabelle), so setzt man das zutreffende Spezifische Gewicht in die Gleichung ein. Für Reihenuntersuchungen hat J. GROSSFELD eine besondere Tabelle<sup>7</sup> berechnet.

Da aber bei der Filtration gewisse Verdunstungsverluste nicht ganz zu vermeiden sind, die sich zu einem Fehler<sup>8</sup> bis zu 6% des

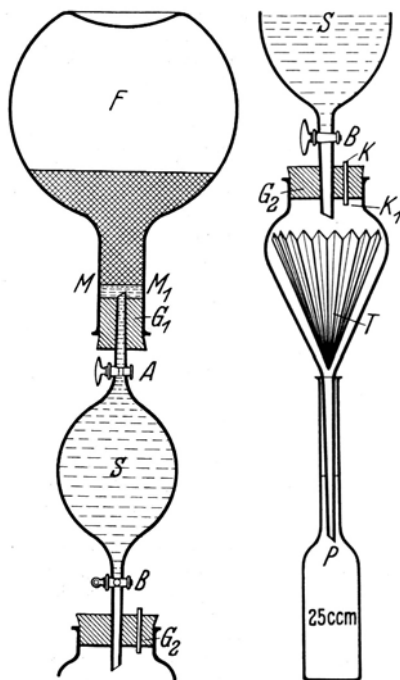


Abb. 5. Vorrichtung zur Filtration der Fettlösung im abgeschlossenen Raum nach J. GROSSFELD.

<sup>1</sup> GROSSFELD empfiehlt die Verwendung eines Kugelschlangenkühlers nach A. BÖMER, der von der Firma Fr. Hegershoff in Leipzig geliefert wird.

<sup>2</sup> J. GROSSFELD: Z. 1925, 49, 286.

<sup>3</sup> Anstatt die Fettlösung in einen Scheidetrichter überzuführen, kann man bei manchen Stoffen (z. B. Butter) das Gemisch von Butter und Trichloräthylen nach der Lösung des Fettes zur Bindung des Wassers mit 5—10 g gebranntem Gips verrühren oder schütteln, worauf sich die abgebundene Gipsmasse zu Boden setzt, und durch einfaches Filtrieren, häufig auch ohne Filtration durch Abgießen eine klare Fettlösung gewinnen läßt.

<sup>4</sup> Sollte das Filtrat durch feinste Tröpfchen der wäßrigen Phase getrübt sein — was übrigens das Ergebnis nicht wesentlich beeinträchtigen wird —, so kann man die Trübung leicht durch Schütteln mit etwas gereinigter Kieselgur und nochmaliges Filtrieren beseitigen.

<sup>5</sup> Die 25 ccm Filtrat mißt man zweckmäßig in einem Pyknometer ab, das man nach der Entleerung mit 10 ccm Trichloräthylen nachspült. Auch bei der Abmessung der 100 ccm Trichloräthylen verwendet man zweckmäßig ein auf Ausfluß geeichtes Kölbchen.

<sup>6</sup> Statt dessen kann man die 25 ccm Lösung auch in ein ERLLENMEYER-Kölbchen geben, die größte Menge des Trichloräthylens über einem Pilzbrenner abdestillieren und das Kölbchen in waagrechter Lage bei 105° bis zur Gewichtskonstanz trocknen.

<sup>7</sup> J. GROSSFELD: Tabelle und Anleitung zur Ermittlung des Fettgehaltes nach vereinfachtem Verfahren. Berlin: Julius Springer 1923. Über die dieser Tabelle zugrunde liegenden Formeln vgl. die Abhandlung von J. GROSSFELD in Z. 1923, 46, 63.

<sup>8</sup> Um diesen Fehler auszugleichen, hat GROSSFELD einen Leerversuch mit reinem Fett bei jeder Versuchsreihe vorgeschlagen.



absoluten Fettgehaltes auswirken und daher bei fettreichen Substanzen (z. B. Butter, Margarine) immerhin ins Gewicht fallen, hat J. GROSSFELD<sup>1</sup> die Filtration der Fettlösung in einen abgeschlossenen Raum verlegt, der nur durch eine Capillare  $KK_1$  mit der Außenluft in Verbindung steht; er bedient sich dabei der im nachfolgenden beschriebenen Vorrichtung<sup>2</sup> (Abb. 5).

Nach völligem Erkalten des Kolbeninhalts auf die Zimmertemperatur, bei der das Trichloräthylen abgemessen wurde, nimmt man vom Rückflußkühler ab und setzt rasch das Schüttelrohr (Abb. 5 *S*) mit geöffneten Hähnen *A* und *B* auf. Darauf schließt man den Hahn *B* und kehrt Kolben *F* und Schüttelrohr *S* um, worauf sich letzteres mit der Fettlösung füllt<sup>3</sup>.

Sobald dies geschehen ist, schließt man den Hahn *A* und dreht abermals um, wodurch der Rest der Flüssigkeit in den Kolben *F* zurückfließt, der dann abgenommen wird. Geringe Mengen anhaftender Säuretröpfchen können vom Kugelrohr *S* und Kautschukstopfen  $G_1$  durch Watte oder Filtrierpapier entfernt werden. Alsdann bringt man durch den weiten Hals des Filtriertrichters *T* ein geöffnetes Faltenfilter von etwa 18,5 cm Durchmesser, gibt etwa 1 g gereinigte Kieselgur darauf und filtriert nach Öffnen der Hähne *A* und *B* die Fettlösung in das 25 ccm-Pyknometer *P*. Die ersten 5—10 ccm Filtrat kann man nach Schließung der Hähne zum Ausspülen des Pyknometers verwenden. Sobald das Pyknometer gefüllt und auf die Marke eingestellt ist, führt man seinen Inhalt unter Nachspülen mit Trichloräthylen in ein 100 ccm-ERLENMEYER-Kölbchen über und bestimmt den Abdampfdruckstand wie oben angegeben. Der Rest der Fettlösung in dem Kugelrohr *S* kann zu einer Kontrolluntersuchung dienen.

Wiedergewinnung des Trichloräthylens nach GROSSFELD<sup>4</sup>: Alle bei den vorstehenden Verfahren sich ergebenden trichloräthylenhaltigen Rückstände flüssiger und fester Art (Emulsionen, Filter usw.) werden in einem großen Kolben gesammelt, bis dieser etwa zur Hälfte gefüllt ist. Der Kolbeninhalt wird mit etwa dem halben Raumteil Wasser verdünnt und angesäuert, der Kolben nach Verbindung mit einem Kühler bis an den Hals in ein Wasserbad gesenkt und durch Erhitzen des Wassers bis zum Sieden die Destillation begonnen und so lange fortgesetzt, wie noch Trichloräthylen übergeht. Ein Schäumen des Inhaltes zeigt bisweilen das Ende der Destillation an. Das aus zwei Schichten (oben Wasser, unten Trichloräthylen) bestehende Destillat wird in einem großen Schütteltrichter zur Beseitigung etwa mit übergegangener Salzsäure mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht und die abgesetzte untere Schicht in einen trockenen Kolben abgelassen. Zur Entfernung der im Trichloräthylen vorhandenen feinen Wassertröpfchen werden auf je 1 l etwa 1—2 g gereinigte trockene Kieselgur zugesetzt, und darauf wird kräftig geschüttelt, worauf sich die Kieselgur nach Adsorption des Wassers flockig abscheidet. Durch Filtration erhält man so ein völlig klares, wieder verwendbares Trichloräthylen.

H. THRON<sup>5</sup> und F. FRITZ<sup>6</sup> machen darauf aufmerksam, daß beim Kochen von Di- und Trichloräthylen mit Alkohol und Ätznatron infolge Chloracetylenbildung Explosionen entstehen können.

### 3. Sonstige Fettbestimmungsverfahren.

#### a) Bestimmung aus dem Spezifischen Gewicht und der Refraktion der Fettlösung.

Wie schon oben (S. 826) kurz angegeben wurde, sind verschiedene Fettbestimmungsverfahren beschrieben worden, die auf der Bestimmung des Spezifischen Gewichtes und der Refraktion der unter bestimmten Bedingungen gewonnenen Fettlösungen beruhen. Die Verfahren erfordern eine große Sorgfalt in der Ausführung, wenn sie genaue Ergebnisse liefern sollen; im anderen Falle ergeben sie nur für technische Zwecke ausreichend genaue Werte. Da die Verfahren zum Teil auch noch nicht genügend nachgeprüft sind, soll von ihrer eingehenden Beschreibung hier abgesehen und sollen nur die Grundzüge der Verfahren angegeben werden; sie beruhen auf der

α) Bestimmung des Spezifischen Gewichtes: Hierher gehören die Verfahren von HERTY und von W. LEITHE<sup>7</sup>, die mit Tetrachlorkohlenstoff [Spez. Gewicht ( $d_{40}^{20}$ )

<sup>1</sup> J. GROSSFELD: Z. 1925, 49, 287.

<sup>2</sup> Die Vorrichtung wird von der Firma Fr. Hegershoff in Leipzig geliefert.

<sup>3</sup> Die Größe des Schüttelrohres ist so bemessen, daß es mit der Fettlösung vollständig gefüllt wird und die Trennungsschicht  $M-M$  noch innerhalb des Kolbens *F* liegt.

<sup>4</sup> J. GROSSFELD: Z. 1923, 46, 63. — Siehe auch Z. 1925, 49, 58.

<sup>5</sup> H. THRON: Chem.-Ztg. 1924, 48, 142.

<sup>6</sup> F. FRITZ: Chem.-Ztg. 1924, 48, 293.

<sup>7</sup> W. LEITHE: Z. 1934, 67, 441, 535; 68, 33, 196.

=1,5937; Siedepunkt 87°] arbeiten. Das Verfahren erfordert eine Temperierung der Lösungen bis auf 0,1° Genauigkeit. — R. SCHWARZ<sup>1</sup> arbeitet mit o-Dichlorbenzol (Spez. Gewicht 1,3; Siedepunkt 179°) und bestimmt das Spezifische Gewicht mittels eines Aräometers (Lipeometers).

β) Bestimmung der Lichtbrechung: D. WESSON und H. ZANDER<sup>2</sup> verwenden Monochlornaphthalin (Halowaxöl) mit  $n_D^{(25^\circ)} = 1,63354$ , während W. LEITHE<sup>3</sup> Benzin mit  $d\left(\frac{20^\circ}{4^\circ}\right) = 0,719$  und  $n_D^{(17,5^\circ)} = 1,40405$  vorschlägt.

### b) Fettbestimmung in tierischen Organen.

Für viele Fragen der Physiologie — namentlich die der Fettbildung aus Proteinen — ist es wichtig, die Gesamtmenge des Fettes (Ätherextraktes, Petrolätherextraktes usw.) der Organe zu bestimmen. Diese Bestimmung bietet insofern Schwierigkeiten, als infolge des hohen Wassergehaltes der Organe die unmittelbare Ausziehung mit den Fettlösungsmitteln nicht ohne weiteres möglich ist, und sodann, weil infolge des Einschusses des Fettes in Zellen die Lösungsmittel nicht alles Fett zu lösen vermögen. Diese Schwierigkeiten hat man dadurch zu beseitigen gesucht, daß man teils die Substanz vor dem Ausziehen getrocknet und dann fein zermahlen hat, teils daß man die Organe zunächst durch Behandeln mit verd. Salzsäure<sup>4</sup> oder mit verd. Salz- oder Schwefelsäure im Autoklaven bei 180°<sup>5</sup> oder mit konz. Salzsäure oder mit Pepsin-Salzsäure<sup>6</sup> oder durch diese und Trypsin<sup>7</sup> oder durch Alkalilauge<sup>8</sup> aufgeschlossen hat, teils endlich dadurch, daß man die Organsubstanz vorher durch Alkohol osmotisch zugänglicher zu machen<sup>9</sup> versucht hat.

Die meisten dieser Verfahren liefern aber kein reines Fett, sondern durch Nichtfett (15—45%) verunreinigte Extrakte und lassen andererseits höhere Fettsäuren (5—10%) unbestimmt. Der durch Verdauung des mit Äther extrahierten getrockneten Fleisches (Casein, Hefe) nachträglich gewonnene Ätherextrakt<sup>6</sup> enthielt nach M. MÜLLER<sup>10</sup> 2,78 bis 2,90% Stickstoff, während der aus denselben Substanzen vor der Pepsinverdauung gewonnene Ätherextrakt davon 0—0,07% enthielt.

Die zuverlässigsten Ergebnisse der Fettbestimmung in tierischen Organen scheint neben der Methode von J. GROSSFELD (S. 829) unter Aufschuß mit konz. Salzsäure das Verfahren von G. ROSENFELD<sup>9</sup> zu liefern, bei dem man, wie folgt, verfährt: 5—20 g des trockenen feinen Pulvers, das man in einer Patrone zugebunden hat, kocht man in einem Becherglase  $\frac{1}{4}$  Stunde lang mit Alkohol; dann wird die Patrone mit der Substanz herausgehoben, abtropfen gelassen und in einem SOXHLETschen Extraktionsapparat 6 Stunden mit Chloroform extrahiert. Darauf kocht man in einem zweiten Becherglase abermals  $\frac{1}{4}$  Stunde mit Alkohol und dann wird mit dem ersten Chloroform nochmals 6 Stunden extrahiert. Das Chloroform wird dann abdestilliert und der Alkohol aus den beiden Bechergläsern verdunstet. Die Rückstände werden in absolutem Äther aufgenommen und in ein gewogenes Kölbchen filtriert, der Äther abdestilliert und der Rückstand nach dem Trocknen gewogen. Will man die verseifbaren und unverseifbaren Bestandteile des Extraktes trennen, so geschieht dies zweckmäßig nach dem Verfahren von M. HÖNIG u. G. SPITZ<sup>11</sup>.

c) Verfahren von W. WEGNER<sup>12</sup>: Zur Fettbestimmung in Samenpulvern, z. B. Senfmehl, werden 3 g Substanz in einem 75 g-Arzneiglas mit 25 g Äther übergossen und gut verschlossen unter öfterem Umschütteln 24 Stunden stehen gelassen. Dann gibt man 5 ccm Wasser und 0,5 g Tragantpulver hinzu und schüttelt sehr kräftig bis zur Ballung der Masse durch. Von der klaren Ätherfettlösung wird nach 1—2 Minuten langem Absitzen soviel wie

<sup>1</sup> R. SCHWARZ: Oil Fat-Ind. 1930, 335; Chem. Umschau d. Fette 1930, 37, 314.

<sup>2</sup> D. WESSON u. H. ZANDER: Z. 1926, 51, 324.

<sup>3</sup> W. LEITHE: Z. 1934, 68, 33.

<sup>4</sup> J. NERKING: Arch. ges. Physiol. 1898, 73, 172. — A. FISCHER: Biochem. Zeitschr. 1926, 175, 449.

<sup>5</sup> N. D. ZELINSKI u. SCH. R. ZINZADE: Biochem. Zeitschr. 1926, 175, 335.

<sup>6</sup> C. DORMEYER: Arch. ges. Physiol. 1895, 61, 341; 1896, 65, 90.

<sup>7</sup> PH. BAMBERGER: Biochem. Zeitschr. 1927, 190, 251. Das Verdauungsprodukt wurde der Dialyse unterworfen und der Petrolätherextrakt mit Salzsäure ausgeschüttelt.

<sup>8</sup> L. v. LIEBERMANN u. S. SZÉKELY: Arch. ges. Physiol. 1898, 72, 360. — M. KUMAGAWA u. K. SUTO: Biochem. Zeitschr. 1908, 8, 212. — E. LABORDE u. ENVER: Bull. Soc. Chim. biol. 1931, 13, 712; C. 1931, II, 2763.

<sup>9</sup> G. ROSENFELD: Zbl. inn. Med. 1900, 21, 833; 1905, 26, Nr. 14; Biochem. Zeitschr. 1928, 200, 280.

<sup>10</sup> M. MÜLLER: Fühlings Landw. Ztg. 1903, 52, 767 u. 831.

<sup>11</sup> M. HÖNIG u. G. SPITZ: Zeitschr. angew. Chem. 1891, 565; Zeitschr. analyt. Chem. 1892, 31, 477.

<sup>12</sup> W. WEGNER: Pharm. Zentralh. 1925, 66, 129.

möglich (15—20 g) in ein mit einem Uhrglas bedecktes Becherglas abgegossen, gewogen, der Äther verdunstet und der Rückstand 1 Stunde im Wassertrockenschranke getrocknet.

Wurden z. B. aus  $a$  g Ätherlösung  $b$  g Fett gewonnen, so beträgt der Gehalt an Fett:  $\frac{25 \cdot b}{a - b} \cdot \frac{100}{3}\%$ .

Das Verfahren erscheint zwar wegen der Verwendung des leichtflüchtigen Äthers und der Nichtberücksichtigung des Fettvolumens nicht einwandfrei, ist aber wegen der Anwendung von Tragant zur Zusammenballung des Pulvers beachtenswert.

d) Verfahren von MARCHAND-CAMILLA<sup>1</sup>: 1 g Substanz wird in einem 25 cm-Zylinder mit 25 ccm Äther geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. 10 ccm der Fettlösung werden in einem Butyrometer mit 10 ccm 95%igem Alkohol und nach dem Umschütteln mit 10 ccm Wasser versetzt, dann einige Minuten kräftig geschüttelt und das Butyrometer in einem Wasserbade von 37—40° erwärmt, bis keine Fetttropfen mehr aufsteigen. Dann wird die Äther-Fettschicht abgelesen.

<sup>1</sup> S. CAMILLA: *Annali Chim. appl.* 1932, **22**, 83; *C.* 1932, **I**, 3514.

# Kohlenhydrate.

Von

Professor **DR. J. GROSSFELD**-Berlin.

Mit 18 Abbildungen.

Die Kohlenhydrate bilden den Hauptbestandteil der sog. „stickstofffreien Extraktstoffe“.

Unter stickstofffreien Extraktstoffen versteht man den Rest, welcher übrig bleibt, wenn man von einer Substanz ihren Gehalt an Wasser, Rohprotein, Rohfett, Rohfaser und Asche abzieht.

Der Begriff „Stickstofffreie Extraktstoffe“ umfaßt demnach eine ganze Reihe mehr oder minder verschiedener Verbindungen, von denen die wichtigsten und verbreitetsten die Zuckerarten, die Dextrine und die Stärke sind; außerdem gehören hierher die Pflanzengummi, Pflanzenschleime, Pflanzensäuren, ferner die Pektin-, Bitter-, Farbstoffe u. dgl. Gewöhnlich werden die stickstofffreien Extraktstoffe, wie oben angegeben, aus der Differenz berechnet. Vielfach ist jedoch auch eine Bestimmung einer oder mehrerer der zu dieser Gruppe gehörigen, gut gekennzeichneten chemischen Verbindungen möglich und erforderlich.

Ein erheblicher Teil der stickstofffreien Extraktstoffe entstammt der Zellmembran, die je nach vorgenommener Behandlung mit Säuren, Alkalien, Oxydationsmitteln, durch Auslaugen mit Wasser, Kochen oder Dämpfen unter gespanntem Wasserdampf, verschiedene Löslichkeitsstufen zeigt, deren schwerstlösliche die nach bestimmten Vorschriften erhaltene Rohfaser (vgl. S. 936) bildet.

Auch die Kohlenhydrate treten in verschiedenen Löslichkeitsstufen auf.

Für die Untersuchung und Zerlegung der Hauptgruppen der stickstofffreien Extraktstoffe und der Bestandteile der Zellmembran empfiehlt sich in Anlehnung an Angaben von J. KÖNIG<sup>1</sup> folgende Gliederung:

- |   |   |  |
|---|---|--|
| 1. In Wasser lösliche Stoffe:   | { | Direkt reduzierende Zucker.<br>Nach schwacher Inversion reduzierende Zucker (Saccharose).<br>Dextrine.<br>Säuren.<br>Pflanzengummi, Pflanzenschleime.<br>Pektin-, Bitter-, Farbstoffe.<br>Hexite (Mannit, Sorbit, Dulcit), Inosit. |
| 2. In verdünnter Mineralsäure (2%iger Salzsäure), in der Wärme lösliche Stoffe:                                 | { | Stärke.<br>Hemipentosane.<br>Hemihexosane.   |
| 3. In konzentrierten Mineralsäuren (72%iger Schwefelsäure oder Salzsäure von spez. Gew. 1,21): lösliche Stoffe: | { | Orthocellulose.<br>Ortholignin (farblos).<br>Orthopentosane.   |
| 4. Unlöslicher Anteil:  | { | Oxydierbar mit Wasserstoffsuperoxyd + Ammoniak: Lignin; nicht oxydierbar: Cutin und Suberin.   |

<sup>1</sup> J. KÖNIG: Neues Verfahren zur chemischen Untersuchung der Futter- und Nahrungsmittel. Berlin: Paul Parey 1930.

## I. Bestimmung der wasserlöslichen Stoffe.

Die wasserlöslichen Stoffe der Lebensmittel bestehen vorwiegend aus den verschiedenen Zuckern; ihre Bestimmung wird unter II, C—G, besonders behandelt.

Hier soll nur die Bestimmung der Gesamtmenge der wasserlöslichen Stoffe — des sog. Extraktes — beschrieben werden.

### 1. Bestimmung des Extraktes durch Wägung der Verdampfungs- oder Extraktionsrückstandes.

Die Bestimmung des Gehaltes an wasserlöslichen Stoffen durch erschöpfendes Ausziehen mit kaltem oder heißem Wasser, Filtrieren und Abdampfen des

Auszuges mit anschließender Wägung des getrockneten Rückstandes ist nicht nur lästig, sondern auch bei Gegenwart von quellenden oder schleimigen Kolloiden (Stärke in der Wärme, Gummiarten, Schleimstoffen usw.), sowie von Zuckerarten und anderen Stoffen, die sich beim Eindampfen zersetzen, meistens nicht exakt durchführbar. Daher empfehlen C. VON DER HEIDE und G. SCHWENK<sup>1</sup>, von einer derartigen direkten Extraktbestimmung stets abzusehen und sie durch eine indirekte zu ersetzen. G. REIF<sup>2</sup> zeigte, daß sie bei Gegenwart von flüchtigen Säuren wie bei Gärungssessig abweichende Ergebnisse liefert, ein Befund, der von J. PRITZKER und R. JUNGKUNZ<sup>3</sup> bestätigt wird. Hinzu kommt, daß die Vertreibung der letzten Wassermengen aus dem Rückstande erst nach sehr langer Trockenzeit und auch dann nur unvollkommen gelingt.

Vorteilhafter ist die indirekte Bestimmung des Extraktes aus dem zurückgewogenen unlöslichen Rückstande.

Hierfür verwendet man, wenn für einen bestimmten Gegenstand nicht besondere Vorschriften gegeben sind, zweckmäßig nicht mehr als 3—5 g. Ist die Substanz verhältnismäßig reich an Fett, so kann es sich empfehlen, die Menge der in Wasser löslichen Stoffe in dem entfetteten Rückstande zu bestimmen.

Man bringt die Substanz verlustlos in einen gewogenen Glastiegel mit Sinterglasboden (z. B. Form 3 G 3 von Schott & Gen. in Jena) und entfettet wie üblich im SOXLETHSchen Extraktionsapparat oder in einem Extraktionsapparate mit unterem Durchlauf ohne Abheberung<sup>4</sup> (Abb. 1), nimmt den Tiegel heraus, läßt den Äther abdunsten und trocknet bei 105° bis zur Gewichtskonstanz. Den Trockenrückstand übergießt man mit Wasser, läßt freiwillig durchtropfen, füllt wieder mit Wasser an und wiederholt diese Behandlung, bis das Filtrat nicht mehr gefärbt ist und alle löslichen Stoffe ausgezogen sind, was in der Regel nach etwa 5—6maligem Anfüllen des Tiegels der Fall ist. Darauf saugt man mit der Saugpumpe möglichst scharf ab, wäscht einmal mit 95%igem Alkohol, dann mit Äther nach und trocknet zunächst bei mäßiger Wärme, um ein Verkleistern der Stärke zu vermeiden, und schließlich bei 105°.

Die Gewichtsabnahme des Tiegels gegenüber der Wägung vor dem Ausziehen mit Wasser entspricht der Menge der durch Wasser in Lösung gegangenen Stoffe.

In den selteneren Fällen, in denen eine direkte Extraktbestimmung durch Verdampfung des Filtrates möglich oder eine ungefähre Kontrolle des durch die indirekte

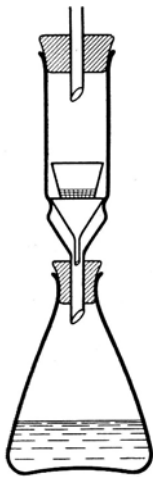


Abb. 1.  
Extraktions-  
apparat nach  
GROSSFELD.

<sup>1</sup> C. VON DER HEIDE u. G. SCHWENK: Zeitschr. analyt. Chem. 1912, 51, 429; C. 1912, II, 257.

<sup>2</sup> G. REIF: Z. 1925, 50, 181.

<sup>3</sup> J. PRITZKER u. R. JUNGKUNZ: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 354.

<sup>4</sup> Vgl. J. GROSSFELD: Z. 1929, 58, 227.

Bestimmung erhaltenen Wertes erwünscht erscheint, verdampft man das vorstehend erhaltene gesamte Filtrat in einer Platinschale zur Trockne, oder man füllt das gesamte Filtrat auf ein bestimmtes Volumen, 0,5 oder 1 Liter, auf, entnimmt hiervon die Hälfte oder ein Viertel und verdampft es in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockne, trocknet darauf bis zur Gewichtsbeständigkeit bei etwa 105° im Trockenschrank — oder noch besser im Vakuum bei 100° —, wägt, verascht und wägt wieder, um so die Menge der in Wasser löslichen organischen und unorganischen Stoffe zu erhalten.

Meistens wird man sich hier auch darauf beschränken können, den Auszug in einer gewogenen Platinschale zu verdampfen und zu veraschen, um die Menge der Aschenbestandteile zu erhalten. Zieht man diese von der Gesamtmenge der in Wasser löslichen Stoffe ab, so erhält man als Rest die organischen Extraktbestandteile.

## 2. Ableitung des Extraktgehaltes aus der Dichte der wäßrigen Lösung bei 20°.

### a) Extraktbestimmungen bei Abwesenheit größerer Mengen von Unlöslichem.

α) Grundlagen der Extraktbestimmung aus der Dichte. Wenn wäßrige Lösungen nur oder vorwiegend Zucker oder andere lösliche Kohlenhydrate enthalten, leitet man ihren Gehalt an Zucker bzw. Extrakt (Trockensubstanz) aus der Dichte bei 20°, bezogen auf Wasser von 4° (der wahren Dichte bei 20°) ab. Eine allgemeine, auf Saccharose bezogene Tabelle, allerdings für die Temperatur 15° und entsprechend dem früheren Brauche noch auf Wasser von gleicher Temperatur bezogen, hat K. WINDISCH<sup>1</sup> nach der amtlichen Tafel der Normal-Eichungs-Kommission<sup>2</sup> berechnet (Tabelle IIA im Anhang).

Eine Tabelle zur Ablesung des Zuckergehaltes wäßriger Zuckerlösungen aus der wahren Dichte bei 20° (Tabelle II B im Anhang) wurde von uns, ebenfalls unter Benutzung der Zuckertabelle der Kaiserlichen Normal-Eichungs-Kommission, neu berechnet<sup>3</sup>. Da auch bei der amtlichen Anweisung zur Untersuchung des Weines die wahre Dichte bei dieser Temperatur zugrunde gelegt wird, erscheint es zweckmäßig, alle Dichteangaben einheitlich als die wahre Dichte, bei 20°, bezogen auf Wasser von 4°, anzugeben.

Zur Umrechnung von Dichteangaben<sup>4</sup> von Zuckerlösungen kann man sich folgender Überlegung bedienen:

Ist  $D_q^p$  das bei  $p^\circ$  gefundene Spezifische Gewicht, bezogen auf Wasser von  $q^\circ$ , so ist das Spezifische Gewicht bei  $x^\circ$ , bezogen auf Wasser von  $y^\circ$ , aus den entsprechenden wahren Dichten des Wassers ( $D_w$ ), sowie der Zuckerlösung ( $D_z$ ) bei den betreffenden Temperaturen, wie folgt, umzurechnen:

$$D_y^x = \frac{D_w^q}{D_w^p} \cdot \frac{D_z^x}{D_z^p} \cdot D_q^p.$$

Die Dichte des Wassers beträgt für die hauptsächlich in Frage kommenden Temperaturen:

| Temperatur<br>( $q$ bzw. $y$ ) | Dichte<br>des Wassers<br>( $D_w$ ) | Temperatur<br>( $q$ bzw. $y$ ) | Dichte<br>des Wassers<br>( $D_w$ ) | Temperatur<br>( $q$ bzw. $y$ ) | Dichte<br>des Wassers<br>( $D_w$ ) |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 4                              | 1,00000                            | 17                             | 0,99880                            | 20                             | 0,99823                            |
| 10                             | 0,99973                            | 17,5                           | 0,99871                            | 21                             | 0,99802                            |
| 15                             | 0,99913                            | 18                             | 0,99862                            | 22                             | 0,99780                            |
| 16                             | 0,99897                            | 19                             | 0,99843                            | 25                             | 0,99707                            |

<sup>1</sup> K. WINDISCH: Tafel zur Ermittlung des Zuckergehaltes wäßriger Zuckerlösungen, Berlin 1896.

<sup>2</sup> F. PLATO, J. DOMKE und H. HARTING: Wissenschaftliche Abhandlungen der Kaiserlichen Normal-Eichungs-Kommission. II. Heft. Die direkte Ausdehnung und Capillarität von Lösungen reinen Rohrzuckers in Wasser. Berlin: Julius Springer 1900.

<sup>3</sup> Die Tabelle enthält bis zur Dichte 1,2500 auch alle den 4. Dichtedezimalen entsprechende Zuckergehalte. Der übrige Teil der Tabelle nur die Werte der 3. Dezimale, ist also auf  $\frac{1}{10}$  gekürzt. Da die Tabelle auch für andere Zuckerarten benutzt wird und zur sonstigen vergleichenden Bestimmung dient, sind die Werte — ebenso wie bei der Tabelle von PLATO — über den Sättigungspunkt der Saccharose (66,3%) hinaus weiter geführt.

<sup>4</sup> Vgl. auch S. 2.

Die Dichte von Zuckerlösungen für Temperaturen von 15 und 20°, sowie die Differenz beider berechnet sich aus den Zahlen von PLATO<sup>1</sup> bei Umrechnung auf Wasser von 4° nach den Angaben für Wasser von 15°, wie folgt:

Tabelle 1. Dichte von Zuckerlösungen bei 15 und 20°.

| Zucker % | $D_{z_4}^{15}$ | $D_{z_4}^{20}$ | Differenz<br>( $\Delta = D_z^{15} - D_z^{20}$ ) | Differenz<br>für je 1° Temperatur-<br>unterschied |
|----------|----------------|----------------|---|---|
| 0        | 0,99913        | 0,99823        | 0,00090   | 0,00018   |
| 5        | 1,01884        | 1,01784        | 0,00100   | 0,00020   |
| 10       | 1,03925        | 1,03813        | 0,00112   | 0,00022   |
| 15       | 1,06041        | 1,05916        | 0,00125   | 0,00025   |
| 20       | 1,08233        | 1,08094        | 0,00138   | 0,00029   |
| 25       | 1,10507        | 1,10354        | 0,00153   | 0,00031   |
| 30       | 1,12863        | 1,12698        | 0,00165   | 0,00033   |
| 35       | 1,15306        | 1,15127        | 0,00179   | 0,00036   |
| 40       | 1,17837        | 1,17648        | 0,00189   | 0,00038   |
| 45       | 1,20460        | 1,20257        | 0,00203   | 0,00041   |
| 50       | 1,23173        | 1,22958        | 0,00215   | 0,00043   |
| 55       | 1,25981        | 1,25753        | 0,00228   | 0,00046   |
| 60       | 1,28884        | 1,28644        | 0,00240   | 0,00048   |
| 65       | 1,31882        | 1,31631        | 0,00251   | 0,00050   |
| 70       | 1,34976        | 1,34716        | 0,00260   | 0,00052   |

Für die Umrechnung anderer Bezugswerte als 4° auf Wasser von 4° kann man somit einfach mit den aus den Wasserwerten berechneten Faktoren malnehmen, z. B.:

$$D_4^{15} = 0,99913 \cdot D_{15}^{15} \quad | \quad D_4^{20} = 0,99823 \cdot D_{20}^{20}$$

Für die Umrechnung der Dichte einer Zuckerlösung auf die Dichte bei einer anderen Temperatur entnimmt man aus obiger Tabelle die der in Frage kommenden Konzentration<sup>2</sup> entsprechenden Werte für  $D_z$  und bildet den Quotienten  $\frac{D_z^x}{D_z^y}$ . Setzt man nun noch die Wasserwerte  $D_w^x$  und  $D_w^y$  ein, so hat man alle zur Umrechnung nötigen Zahlenwerte.

Beispiel. Es sei die gefundene Dichte  $D_{z_{20}}^{20} = 1,0386$ , die gesuchte  $D_{z_4}^{15}$ , so ist:  $x = 15$ ,  $y = 4$ ,  $p = 20$ ,  $q = 20$ ,  $D_w^{20} = 0,99823$ ,  $D_w^4 = 1,00000$ . Nun entspricht  $D_{z_{20}}^{20} = 1,0386$  nach vorstehender Tabelle einem Gehalte von rund 10% Zucker. Demnach setzen wir nach dieser Dichtetafel  $D_{z_{15}}^{15} = 1,03925$ ,  $D_{z_{20}}^{20} = 1,03813$  und erhalten:

$$D_{z_4}^{15} = \frac{0,99823}{1,00000} \cdot \frac{1,03925}{1,03813} \cdot D_{z_{20}}^{20} = 0,99931 \cdot D_{z_{20}}^{20}$$

Diese etwas umständlich erscheinende Rechnung kann oft vereinfacht werden, wenn man aus obiger Tabelle die Dichtedifferenzen bei verschiedenen Wärmegraden addiert oder subtrahiert; so wird man z. B. zur Umrechnung von  $D_{z_4}^{20}$  in  $D_{z_4}^{15}$  die Differenz  $\Delta = D_z^{15} - D_z^{20}$  bilden und einfach, wie folgt, rechnen:

$$D_{z_4}^{15} = D_{z_4}^{20} + \Delta, \text{ bzw. } D_{z_4}^{20} = D_{z_4}^{15} - \Delta$$

Wie ein Blick auf obige Tafel zeigt, ist  $\Delta$  von der Konzentration etwas, aber verhältnismäßig nur wenig, abhängig.

$\beta$ ) Die praktische Ausführung der Dichtebestimmung erfolgt am sichersten mittels eines Pyknometers (S. 7), vielfach auch, wenn auch weniger genau, mittels der WESTPHAL'Schen Waage (S. 10). Bei Benutzung dieser Apparate ist darauf zu achten, ob sie auf die Wasserdichte von 4° geeicht sind;

<sup>1</sup> F. PLATO: Wissenschaftliche Abhandlungen der Kaiserlichen Normal-Eichungs-Kommission 1900, 2, 240. Vgl. LANDOLT-BÖRNSTEIN: Physikal.-chem. Tabellen, 3. Auflage, 1905, S. 364—365.

<sup>2</sup> Es genügt hier die Konzentration angenähert, aber natürlich bei  $D_z^x$  und  $D_z^y$  gleich einzusetzen.

im anderen Falle ist vor Benutzung der Tabelle nach obigen Formeln zunächst auf diese Wasserdichte umzurechnen.

Die umgekehrte Ablesung der Dichte aus dem Zuckergehalte, den man etwa mit dem Saccharometer bestimmt hat, kann unschwer ebenfalls nach der Zuckertabelle (Tabelle II im Anhang dieses Bandes) nötigenfalls mittels Interpolation erfolgen.

Die Tabelle gilt streng genommen nur für Saccharoselösungen; das BALLINGSche Saccharimeter, das vorwiegend in der Brauerei Verwendung findet, ist ebenfalls für Saccharoselösungen eingestellt; andere Flüssigkeiten, z. B. Liköre, enthalten als einzigen Extraktstoff meistens nur Saccharose und, wo neben diesem, wie z. B. bei Fruchtsäften und Honig, mehr oder weniger Invertzucker vorhanden ist, ist die Tabelle ebenfalls anwendbar, weil Invertzuckerlösungen mit gleich konzentrierten Saccharoselösungen ein nahezu übereinstimmendes spezifisches Gewicht besitzen.

O. HÖGL<sup>1</sup> gibt das spezifische Lösungsvolumen von anderen Zuckerarten als Saccharose und weiteren nichtflüchtigen Stoffen, wie sie z. B. im Wein vorkommen, wie folgt an:

|                          |       |                              |         |
|--------------------------|-------|------------------------------|---------|
| Saccharose . . . . .     | 0,612 | Kaliumbitartrat . . . . .    | 0,436   |
| Glucose . . . . .        | 0,612 | Kaliumbimalat . . . . .      | 0,510   |
| Fructose . . . . .       | 0,612 | Kaliumbisuccinat . . . . .   | 0,384   |
| Glycerin . . . . .       | 0,756 | Monokaliumphosphat . . . . . | 0,295   |
| Eiweiß . . . . .         | 0,740 | Calciumacetat . . . . .      | 0,462   |
| Weinsäure . . . . .      | 0,511 | Kaliumsulfat . . . . .       | 0,186   |
| Äpfelsäure . . . . .     | 0,613 | Magnesiumsulfat . . . . .    | — 0,014 |
| Milchsäure . . . . .     | 0,756 | Kaliumtartrat . . . . .      | 0,331   |
| Bernsteinsäure . . . . . | 0,689 | Kaliumalat . . . . .         | 0,410   |
| Gerbsäure . . . . .      | 0,610 |                              |         |

Aus Angaben von G. KOESTLER<sup>2</sup> für die Dichte berechnet man als reziproke Werte für das Volumen gelöster Milchbestandteile

|                           | Milchzucker | Calciumcaseinat<br>(Mittel) | Milchsalze |
|---------------------------|-------------|-----------------------------|------------|
| Dichte ( $D_{4}^{20}$ ) = | 1,607       | 1,454                       | 2,619      |
| Volumen =                 | 0,622       | 0,688                       | 0,382      |

Man erkennt aus diesen Zahlen, inwieweit Fehler entstehen können, wenn man den aus anderen Stoffen als Zucker bestehenden Extrakt als „Rohrzucker“ berechnet.

γ) Von sehr großem Einfluß auf das Ergebnis der Dichtebestimmung sind gelöste Mengen Alkohol oder Kohlensäure in der zu prüfenden Flüssigkeit. Auch Essigsäure beeinflusst die Dichte wäßriger Zuckerlösungen. Diese Stoffe sind daher vorher zu entfernen oder durch besondere Rechnung zu berücksichtigen.

Die Entfernung der Kohlensäure gelingt bereits durch wiederholtes kräftiges Schütteln in einem geräumigen Kolben und darauf folgendes Filtrieren durch ein bedecktes Faltenfilter, besser, wenn diese Behandlung mit der auf 40—50° erwärmten Flüssigkeit vorgenommen wird, mit Sicherheit dadurch, daß man die Flüssigkeit einige Minuten im Sieden hält, worauf man dann wieder auf die ursprüngliche Raummenge bringt.

Vorhandener Alkohol wird aus einer wäßrigen Zuckerlösung entfernt, indem man sie auf etwa ein Viertel auf dem Wasserbade eindampft<sup>3</sup> oder den Alkohol zwecks Bestimmung nach S. 1008 abdestilliert, und dann den Rückstand wieder auf die ursprüngliche Raummenge auffüllt.

Ein Essigsäuregehalt wird bei der Extraktbestimmung nach der amtlichen Weinuntersuchung<sup>4</sup> berücksichtigt, indem man unterscheidet, ob der Wein flüchtige Säuren

<sup>1</sup> O. HÖGL: Z. 1929, 57, 297.

<sup>2</sup> G. KOESTLER: Landw. Jahrb. Schweiz 1927, 41, 822.

<sup>3</sup> Hierbei darf jedoch keine Abscheidung von Stoffen eintreten.

<sup>4</sup> Amtliche Anweisung für chemische Untersuchung des Weines; Bekanntmachung des Reichsministers des Innern über den Vollzug des Weingesetzes vom 9. Dez. 1920.



in größerer Menge als 1,2 g in 1 Liter, berechnet als Essigsäure, enthält oder nicht. Über das Nähere hierzu vgl. bei Wein.

Eine Kontrolle der Richtigkeit der Dichtebestimmung bei Gegenwart von Alkohol besteht darin, daß man das Spezifische Gewicht des alkoholischen Destillates ( $D_1$ ) und das spezifische Gewicht des Rückstandes, ( $D_2$ ), beide auf das gleiche ursprüngliche Volumen aufgefüllt, addiert, wobei sich bis auf wenige (3—4) Einheiten in der vierten Dezimalstelle, abgesehen von dem durch die Gegenwart der flüchtigen Säuren bedingten Fehler, wieder das spezifische Gewicht der ursprünglichen Flüssigkeit  $D$ , erhöht um die Dichte des Wassers bei 20°, ergeben muß, also

$$D_1 + D_2 = D + 0,9982 \quad | \quad D_2 = D - D_1 + 0,9982.$$

Kennt man den Alkoholgehalt einer Flüssigkeit, so kann man die umgekehrt entsprechende Dichte für  $D_1$  einsetzen und somit nach der letzten Gleichung  $D_2$  aus  $D$  berechnen.

δ) Sind die Zuckerlösungen dagegen dickflüssig, sirupartig, wie z. B. bei Honig, Fruchtsirupen, Sirupen usw., so muß man zur genauen Bestimmung des spezifischen Gewichtes zunächst eine verdünntere Lösung herstellen; man löst eine abgewogene Menge der sirupdicken Flüssigkeit in Wasser, füllt auf ein bestimmtes Volumen auf (gewöhnlich 20 g oder 10 g in 100 ccm) und bestimmt in dieser Lösung das spezifische Gewicht. Aus diesem ergibt sich nach der Tabelle IIB (im Anhang) der Extraktgehalt in 100 ccm der Lösung und daraus durch Malnehmung mit dem Verdünnungsfaktor (bei obiger Verdünnung mit 5 bzw. 10) die Menge Extrakt in der abgewogenen Substanzmenge.

Für die Berechnung der Trockenmasse von Honig und Kunsthonig haben F. AUERBACH und G. BORRIES<sup>1</sup> aus der Dichte auf Grund sorgfältiger Untersuchungen besondere Beziehungen abgeleitet.

#### b) Extraktbestimmung bei größeren Mengen von Unlöslichem.

Bei Extraktbestimmungen in Stoffen, die nicht vollständig in Wasser löslich sind, besteht die erste Aufgabe darin, eine homogene Lösung der Extraktbestandteile darzustellen, also in der Abtrennung der unlöslichen Bestandteile. Da durch Erhitzen die Löslichkeitsverhältnisse der Kolloide wesentlich beeinflußt werden (Quellung und Verkleisterung der Stärke, Inlösunggehen vieler Gallerten, Koagulation von Proteinstoffen usw.), wird man die Extraktlösung möglichst in der Kälte herstellen oder bei warmer Bereitung diesen Umstand besonders hervorheben.

Zur Abtrennung des Unlöslichen dient in der Regel die Filtration durch Filtrierpapier, und zwar meistens die Filtration der auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Extraktaufschwemmung durch ein trockenes Faltenfilter unter Verarbeitung nur eines aliquoten Teiles des Filtrates. Durch Filtrierpapier werden im allgemeinen Teilchen der Größenordnung von 0,001 mm und darüber zurückgehalten. Eine Abscheidung noch kleinerer Teilchen (bis etwa 0,0001 mm) erreicht man durch Anwendung von Kieselgur, mit der man die zu filtrierende Flüssigkeit schüttelt, oder Filtration durch das im Handel erhältliche Kieselgurfiltrierpapier<sup>2</sup>, dessen Wirkung auch durch Zusatz von Kieselgur zum zu filtrierenden Gemisch noch erhöht wird. Kolloid gelöste Stoffe werden jedoch auch durch Kieselgur nicht zurückgehalten.

Bei manchen Niederschlägen verläuft die Filtration außerordentlich langsam, so daß durch Verdunstungsverluste an Wasser vom Filter her Konzentrationszunahmen in der Lösung eintreten können, die ein unrichtiges Ergebnis für den Extraktgehalt zur Folge haben. Verringern lassen sich solche Abweichungen durch Bedecken des Trichters mit dem Filter durch ein Uhrglas od. dgl. Besser sind solche Filtrationen in einem Kapseltrichter (Abb. 2) durchzuführen. Dieser wird mit einem Faltenfilter beschickt, auf einen Vorlagekolben gestellt und dann das zu filtrierende Gemisch durch einen kleinen Trichter auf das Filter gegossen, wobei man nur darauf zu achten hat, daß die Flüssigkeit nicht

<sup>1</sup> F. AUERBACH u. G. BORRIES: Z. 1924, 47, 177; 48, 272.

<sup>2</sup> Hersteller: Macherey, Nagel & Co. sowie „Delta“, Papier und Filter G. m. b. H., beide in Düren.

über den Filtrerrand läuft. Mit dieser Vorrichtung<sup>1</sup> lassen sich selbst tagelange Filtrationen ohne wesentliche Konzentrationszunahme der wäßrigen Flüssigkeit vornehmen. — Ein Verderben der Mischungen hierbei infolge biologischer Zersetzungen (Gärungen, Fäulnisvorgänge) hemmt man durch Zusatz einiger Tropfen Toluol.

Schwierig filtrierbare Bestandteile lassen sich schließlich auch durch Abschleudern, oder auch Absetzenlassen und Dekantieren abscheiden, wenn ihre Dichte höher als die der Lösung ist. Bei Fetten und Ölen kann man diese Erhöhung der Dichte durch Schütteln mit Trichloräthylen, das sich in der wäßrigen Phase fast gar nicht löst, erreichen.

Zur sicheren und schnellen Abscheidung kleiner Sedimentmengen aus größeren Flüssigkeitsmengen empfiehlt SPROCKHOFF<sup>2</sup> eine Überlaufzentrifuge, mit der sich z. B. ein Liter stärkehaltiges Wasser in etwa 3 Minuten klären läßt.

Behandelt man nun zwecks Bestimmung des Extraktgehaltes einen Stoff, der größere Mengen an in Wasser unlöslichen Bestandteilen enthält, mit Wasser, füllt auf ein bestimmtes Volumen auf, filtriert, bestimmt in einem aliquoten Teile des Filtrates den Extraktgehalt und rechnet diesen durch einfache Malnehmung auf das Volumen um, auf das man aufgefüllt hat, so begeht man durch Vernachlässigung des Volumens des Unlöslichen einen Fehler, der diesem Volumen direkt, dem Volumen, zu dem man auffüllt, umgekehrt proportional ist. Wenn es sich bei den unlöslichen Stoffen um kolloide, hydrophile Gebilde — z. B. Gallerten — handelt, wird die so entstehende Abweichung zwar durch Diffusionsvorgänge, die in einem langsamen Übergehen der Extraktbestandteile in die Flüssigkeit bestehen, stark verringert, in vielen Fällen so weit, daß sie vernachlässigbar klein wird, wenn man durch feine Verreibung des zu prüfenden Stoffes und genügend langes Auslaugen unter zeitweiligem Umschütteln diese Vorgänge unterstützt.

Besteht dagegen das Unlösliche nicht aus den genannten Stoffen, so ist sein Volumen zu berücksichtigen. Besonders wichtig ist dies bei fett- oder ölricheren Stoffen. Für die Lösung dieser Aufgabe bieten sich verschiedene Wege.

α) Extraktbestimmung mit konstantem Volumen des Lösungsmittels, des Wassers<sup>3</sup>.

Man bestimmt in dem zu prüfenden Stoffe zunächst durch besonderen Versuch den Wassergehalt. Dann fügt man aus einer Bürette zu einer abgewogenen Menge des Stoffes so viel Wasser hinzu, daß dessen Gesamtmenge also entsprechend dem Volumen des vorhandenen vermehrt um das Volumen des zugesetzten, eine bestimmte Raummenge  $m$ , z. B. 100,18 ccm bei 20° = 100 g beträgt. Bestimmt man nun in der so erhaltenen und durch ein trockenes Filter filtrierten Mischung die Dichte, so ergibt sich aus der Tabelle II im Anhang dieses Bandes der Prozentgehalt der Lösung an Extrakt und damit auch an Wasser, durch Subtraktion des Extraktwertes von 100. Nennen wir die Gesamtextraktmenge  $x$ , die Extraktmenge in Prozent der Lösung  $E$ , also die Wassermenge  $(100 - E)$  und die insgesamt zugesetzte Wassermenge  $m$ , so ist offenbar das Verhältnis von Extrakt zu Wasser im Filtrat bzw. in einem Anteil des Filtrates dasselbe wie in der Gesamtlösung; es verhält sich also:

$$x \cdot m = E : (100 - E), \text{ also } x = \frac{m \cdot E}{100 - E} \text{ g, für } m = 100 \text{ g wird } x = \frac{100 E}{100 - E} \text{ g.}$$

<sup>1</sup> Hersteller: P. Altmann, Berlin, Luisenstr.

<sup>2</sup> Die Zentrifuge ist von der Glasbläserei des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin N 65, Seestr. 13, zu beziehen.

<sup>3</sup> Vgl. auch J. GROSSFELD: Z. 1924, 48, 160.

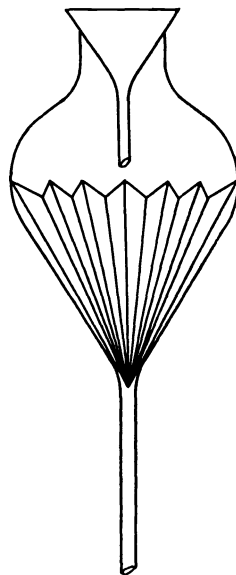


Abb. 2. Kapseltrichter nach GROSSFELD.

Die folgende Tabelle ermöglicht die direkte Ablesung der dieser Formel entsprechenden Extraktmengen aus der Dichte bei 20°.

Tabelle 2. Berechnung des Extraktes beim Lösen in konstanter Wassermenge aus der Dichte bei 20°/4°.  
Lösungsmittel: 100,00 g Wasser.

| $D_{40}^{20}$ | 0,0000                     | 0,0010 | 0,0020 | 0,0030 | 0,0040 | 0,0050 | 0,0060 | 0,0070 | 0,0080 | 0,0090 | Für je<br>0,0001<br>im Mittel: |
|---------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------------------------|
|               | Gesamte Extraktmenge in g. |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                                |
| 1,0000        | 0,46                       | 0,72   | 0,98   | 1,25   | 1,51   | 1,78   | 2,04   | 2,31   | 2,58   | 2,85   | 0,027                          |
| 1,0100        | 3,11                       | 3,38   | 3,65   | 3,92   | 4,20   | 4,47   | 4,75   | 5,02   | 5,30   | 5,58   | 0,027                          |
| 1,0200        | 5,86                       | 6,14   | 6,42   | 6,71   | 6,99   | 7,27   | 7,56   | 7,84   | 8,13   | 8,42   | 0,028                          |
| 1,0300        | 8,71                       | 9,00   | 9,30   | 9,59   | 9,88   | 10,18  | 10,47  | 10,77  | 11,07  | 11,37  | 0,030                          |
| 1,0400        | 11,67                      | 11,97  | 12,27  | 12,58  | 12,88  | 13,19  | 13,49  | 13,80  | 14,11  | 14,42  | 0,031                          |
| 1,0500        | 14,73                      | 15,04  | 15,36  | 15,67  | 15,99  | 16,30  | 16,62  | 16,94  | 17,26  | 17,78  | 0,032                          |
| 1,0600        | 17,91                      | 18,23  | 18,56  | 18,89  | 19,22  | 19,55  | 19,88  | 20,21  | 20,54  | 20,88  | 0,033                          |
| 1,0700        | 21,22                      | 21,55  | 21,89  | 22,23  | 22,57  | 22,91  | 23,26  | 23,60  | 23,95  | 24,30  | 0,034                          |
| 1,0800        | 24,66                      | 25,01  | 25,36  | 25,71  | 26,07  | 26,42  | 26,78  | 27,14  | 27,50  | 27,85  | 0,036                          |
| 1,0900        | 28,24                      | 28,60  | 28,97  | 29,34  | 29,71  | 30,08  | 30,45  | 30,82  | 31,20  | 31,58  | 0,037                          |
| 1,1000        | 31,96                      | 32,34  | 32,72  | 33,13  | 33,49  | 33,88  | 34,27  | 34,66  | 35,06  | 35,45  | 0,039                          |
| 1,1100        | 35,85                      | 36,25  | 36,45  | 37,05  | 37,46  | 37,86  | 38,27  | 38,68  | 39,09  | 39,50  | 0,041                          |
| 1,1200        | 39,92                      | 40,33  | 40,75  | 41,17  | 41,60  | 42,02  | 42,44  | 42,87  | 43,30  | 43,73  | 0,042                          |
| 1,1300        | 44,16                      | 44,59  | 45,02  | 45,46  | 45,90  | 46,34  | 46,79  | 47,23  | 47,68  | 48,13  | 0,044                          |
| 1,1400        | 48,59                      | 49,04  | 49,50  | 49,96  | 50,42  | 50,88  | 51,35  | 51,82  | 52,29  | 52,76  | 0,046                          |

### β) Bestimmung des Volumens des Unlöslichen.

Behandelt man nun in einem weiteren Versuch die gleiche Menge des zu prüfenden Stoffes mit Wasser und füllt auf ein bestimmtes Volumen auf, das man zweckmäßig so wählt, daß es mit dem Volumen der beim ersten Versuch zugesetzten Wassermenge übereinstimmt, und bestimmt wieder im Filtrate Dichte und scheinbaren Extraktgehalt, den wir  $x_1$  nennen wollen, während  $y$  das Volumen des Unlöslichen bleibt, so müssen wir, um aus  $x_1$  den wahren Extraktgehalt  $y$  zu finden,  $x_1$  mit  $100 - y$  malnehmen, also

$$x = x_1 \frac{100 - y}{100}, \text{ daraus } y = 100 \left( 1 - \frac{x}{x_1} \right).$$

A. HANAK<sup>1</sup> stellt zu Bestimmung des Volumens des wasserunlöslichen Teiles von Marmeladen, Gemüsen, Früchten, Schokolade usw. eine Lösung bzw. Aufschlammung her, die 20 g in 100 ccm enthält, filtriert und bestimmt bei sorgfältiger Innehaltung der Eichungstemperatur des Pyknometers die Dichte des Filtrates. Andererseits stellt er eine gleich konzentrierte Aufschlammung im Pyknometer selbst her, bringt auf die Eichungstemperatur und bestimmt gleichfalls das spezifische Gewicht. Diese Aufschlammung benutzt er dann zur Bestimmung des Prozentgehaltes an Unlöslichem, indem er durch einen gewogenen GOOCH-Tiegel absaugt, mit Wasser nachwäscht und bei 105° trocknet. Ist nun

- $G$  das Gewicht des Unlöslichen von 10 g der Marmelade,
- $b$  das Gewicht der 50 ccm der aufgeschlammten 10 g-Marmelade,
- $a$  das von 50 ccm des Filtrates,
- $D$  die Dichte des Filtrates,
- $x$  das gesuchte Volumen,

so berechnet sich dieses nach der Gleichung:

$$x = 10 \frac{G - b + a}{D}.$$

Bedingung für ein exaktes Ergebnis ist aber ein sehr genaues Arbeiten.

### γ) Berechnung des Volumens des Unlöslichen aus anderweitigen Bestimmungen.

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln, deren sonstige Zusammensetzung durch besondere Versuche, so des Fettgehaltes durch eine besondere Fettbestimmung ermittelt ist, genügt es für die genaue Extraktbestimmung meistens, das Volumen des Unlöslichen angenähert zu berechnen oder abzuschätzen. So wird man das Volumen von 1 g Fett oder

<sup>1</sup> A. HANAK: Z. 1921, 41, 179.

Öl in dem zu prüfenden Stoffe im allgemeinen mit  $\frac{1}{0,92} = 1,1$  ccm ansetzen können. Man füllt dann entweder auf das bestimmte Volumen ( $m$ ) auf, filtriert und bestimmt im Filtrate den Extraktgehalt, den man dann am Schluß mit einem besonders berechneten Korrekturfaktor  $\left(F = \frac{m-x}{m}\right)$  malnimmt. — Ebenso einfach ist es aber auch auf das gewünschte Volumen aufzufüllen und dann noch soviel Wasser zuzugeben, als der Raummenge des Unlöslichen entspricht.

Bei allen diesen Berechnungen sind Adsorptionsvorgänge, die die Konzentration des gelösten Extraktes verringern, nicht berücksichtigt. Allerdings ist der hierdurch entstehende Fehler außer bei sehr geringen Konzentrationen meist vernachlässigbar klein.

### 3. Extraktbestimmung nach sonstigen Verfahren.

#### a) Extraktbestimmung aus der Lichtbrechung.

Die Einfachheit und leichte Ausführbarkeit refraktometrischer Messungen an sich hat auch zu ihrer Verwendung zu Extraktbestimmungen geführt. Bereits 1884 hat STROHMER<sup>1</sup> für rein wäßrige 1–50%ige Saccharoselösungen die Brechungszahlen angegeben, darauf STOLLE Tabellen für Saccharose, Glucose, Fructose, Galaktose berechnet. Auch vergleichende Extraktbestimmungen auf Grund der Lichtbrechung und der Dichte der Lösung wurden von LANGE, WIECHMANN und PRINSEN-GEERLICH, bei Honig von UTZ, ausgeführt. TOLMAN und SMITH haben angegeben, daß bei einer Konzentration von mehr als 20% das Brechungsvermögen von Saccharoselösungen von dem der Lösungen anderer Zuckerarten praktisch nicht verschieden ist, während G. BRUHNS an selbst hergestellten Invertzuckerlösungen aus Saccharoselösungen unregelmäßige Abweichungen beobachtete.

Nach D. SCHENK<sup>2</sup> eignet sich das Butterrefraktometer zur Bestimmung des Extraktgehaltes in Marmeladen, Malzextrakt und Honig. Der Skalenbereich umfaßt Zuckergehalte von 52–82%. Eine 60%ige Saccharoselösung entspricht dem Skalenteil 26,5, eine 70%ige 59,5, mithin je ein Skalenteil 0,300% Zucker. Dextrine, Eiweißstoffe u. a. können Abweichungen bedingen. AUERBACH und BORRIES zeigten, daß besonders die Brechung einer 50%igen Lösung von Kunsthonig, ermittelt im ABBESchen Refraktometer mit heizbaren Prismen, zur Trockensubstanzbestimmung geeignet ist. Das gleiche trifft nach diesen<sup>3</sup> bei echten Honigen zu. H. ECKART<sup>4</sup> empfiehlt das GOERZ-Zuckerrefraktometer Nr. 3050 zur Feststellung des Extraktgehaltes von frischen Fruchtsäften und gibt in Gemeinschaft mit A. DIEM<sup>5</sup> ausführliche Berechnungstabellen an. Für die Extrakt- (und Alkohol-) Berechnung bei Bier empfehlen P. LEHMANN und F. GERUM<sup>6</sup> besondere Berechnungsformeln. — Auf die Einzelheiten dieser Arbeiten kann hier nicht eingegangen werden.

#### b) Bestimmung gelöster organischer Stoffe mit Chromsäure nach TH. v. FELLEBERG<sup>7</sup>.

Bei dieser Arbeitsweise wird die Eigenschaft der Kohlenhydrate und anderer organischer Stoffe Chromsäure bei Gegenwart von Schwefelsäure in bestimmter Weise zu reduzieren verwendet. Sie eignet sich besonders zur quantitativen Bestimmung sehr geringer Mengen von organischen Extraktbestandteilen.

Für die Bestimmung mißt man mit einer genauen, in 0,01 ccm eingeteilten Pipette, soviel wäßrige Flüssigkeit ab, wie etwa 3–6 mg organischem Stoffe entspricht, und gibt die Menge in ein 50 ccm ERLLENMEYER-Kölbchen. Dann gibt man 10 ccm 0,1 N.-Kaliumbichromatlösung und vorsichtig unter Umschwenken aus einem Meßzylinder 20 ccm und außerdem für je 1 ccm zu

<sup>1</sup> Nach F. AUERBACH u. G. BORRIES: *Z.* 1922, 43, 297. Ebenso die folgenden Angaben.

<sup>2</sup> D. SCHENK: *Chem.-Ztg.* 1933, 57, 234 u. *Z.* 1934, 67, 187.

<sup>3</sup> AUERBACH u. BORRIES: *Z.* 1924, 48, 272. <sup>4</sup> H. ECKART: *Z.* 1925, 50, 196.

<sup>5</sup> A. DIEM: *Z.* 1926, 51, 48. <sup>6</sup> P. LEHMANN u. F. GERUM: *Z.* 1914, 28, 392.

<sup>7</sup> TH. v. FELLEBERG: *Biochem. Zeitschr.* 1927, 188, 365.

untersuchender Flüssigkeitsmenge noch weiter je 2 ccm konz. Schwefelsäure hinzu. Die sich erwärmende Flüssigkeit muß dann einen bräunlichgrünen bis olivgrünen Ton annehmen; eine weingrüne Färbung zeigt an, daß die Bichromatmenge nicht genügt. Nach  $\frac{1}{4}$  Stunde — oder auch beliebig später — wird die Flüssigkeit in einen geräumigen Kolben gegossen und mit Wasser gut nachgespült. Man verdünnt auf 300—350 ccm, läßt einige Minuten stehen, bis keine Luftblasen mehr sichtbar sind und setzt dann etwa 0,2 g Kaliumjodid hinzu. Darauf wird mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert. Hierbei sollen als Zeichen eines genügenden Überschusses an Chromsäure wenigstens 2 ccm verbraucht werden. — Ein Leerversuch ergibt den Titer der vorgelegten Chromsäuremenge.

Bei dieser Behandlung werden nach v. FELLEBERG Saccharose, Glucose, Lactose, ferner auch Glycerin, Mannit, Ameisensäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Benzoesäure und Methylalkohol restlos zu Kohlendioxyd oxydiert, während Propionsäure, Buttersäure, Isovaleriansäure und Äthylalkohol je 1 Mol Essigsäure liefern. Unverändert bleiben Essigsäure und Oxalsäure, fast unverändert Glykokoll und Alanin; von Bernsteinsäure wurden nur etwa 12—13% oxydiert.

Die je 1 ccm 0,1 N.-Kaliumbichromatlösung entsprechende Menge<sup>1</sup> beträgt übereinstimmend mit vorstehender Theorie für:

|                    |         |                       |         |                        |         |
|--------------------|---------|-----------------------|---------|------------------------|---------|
| Saccharose . . . . | 0,71 mg | Äpfelsäure . . . .    | 1,12 mg | Isovaleriansäure . . . | 0,51 mg |
| Glucose . . . . .  | 0,75 „  | Weinsäure . . . . .   | 1,50 „  | Benzoesäure . . . . .  | 0,41 „  |
| Lactose . . . . .  | 0,75 „  | Citronensäure . . . . | 1,17 „  | Äthylalkohol . . . . . | 1,15 „  |
| Glycerin . . . . . | 0,66 „  | Ameisensäure . . . .  | 2,30 „  | Methylalkohol . . . .  | 0,54 „  |
| Mannit . . . . .   | 0,72 „  | Buttersäure . . . . . | 0,60 „  |                        |         |

Abweichend von der Berechnung ergaben:

| Gegenstand   |           | Propion-<br>säure | Propyl-<br>alkohol | Isobutyl-<br>alkohol | Isoamyl-<br>alkohol | Salicyl-<br>säure | Tyrosin |
|--|-----------|-------------------|--------------------|----------------------|---------------------|-------------------|---------|
| Verbrauch an<br>Bichromatlösung für<br>1 mg in ccm | berechnet | 0,81              | 1,67               | 2,16                 | 2,50                | 2,03              | 2,10    |
|  | gefunden  | 1,08              | 1,54               | 2,44                 | 1,51                | 1,80              | 1,94    |
| 1 ccm entspricht mg . . . . .                      |           | 0,95              | 0,65               | 0,41                 | 0,66                | 0,56              | 0,52    |

Für Eiweißstoffe wurden an Kubikzentimeter für 1 mg (an mg entspricht 1 ccm:) gefunden: Eialbumin 1,12 (0,89), Gelatine 0,99 (1,01) Casein, techn. 1,08 (0,93), Gluten, Kleber, techn. 1,19 (0,84).

Für den Extraktgehalt von Teeauszügen fand v. FELLEBERG, daß je 1 mg asche-freiem Extrakt 1,37 ccm 0,1 N.-Kaliumbichromatlösung, also 1 ccm der letzteren 0,73 mg Extrakt entsprach.

#### 4. Bestimmung und Abscheidung der wasserlöslichen Kohlenhydrate.

Diese erfolgt nach den unter II, C—G, aufgeführten Methoden.

Nach S. ROTHENFUSSE<sup>2</sup> lassen sich die Zuckerarten, insbesondere auch Saccharose in methylalkoholischer Lösung quantitativ in Verbindung mit je 1 Mol Bariumhydroxyd (oder Strontiumhydroxyd) in der Kälte ausfällen und damit von Begleitstoffen trennen, wenn diese Abscheidung im Entstehungs-augenblick stattfindet und durch genügende Alkoholkonzentration eine Disso-ziation ausgeschlossen wird. Im Gegensatz zu den Reduktionsmethoden wird der Zucker hier also nicht zerstört, sondern chemisch als solcher abgeschieden.

Nach ROTHENFUSSE werden so z. B. 10 ccm einer 10%igen Lösung von Zucker (Saccharose) mit 30 ccm Methylalkohol vermischt, langsam 40 ccm 0,25 N methylalkoholi-sche Barytlauge unter ständigem Umschwenken zufließen gelassen, mit Methylalkohol auf 100 ccm aufgefüllt, filtriert und im Filtrat der Barytüberschuß zurücktitriert. 1 ccm 0,25 N Barytlauge entspricht 0,04274 g Saccharose.

<sup>1</sup> Nach den Angaben von v. FELLEBERG für die Menge Kaliumbichromatlösung für 1 mg umgerechnet.

<sup>2</sup> S. ROTHENFUSSE: Z. 1933, 66, 182.

Aus dem Niederschlag lassen sich die Zuckerarten durch Lösen in Wasser und Einleiten von Kohlendioxyd zur Abscheidung des Baryts leicht wieder gewinnen. Das Verfahren kann so z. B. zur Aufarbeitung von Hydrolysaten an Stelle langwieriger und unsicherer Krystallisationen wertvolle Dienste leisten. Vgl. S. 961.

### 5. Bestimmung fremdartiger Begleitstoffe der Kohlenhydrate im wäßrigen Auszuge.

Der wäßrige Auszug dient meistens auch zur Bestimmung sonstiger wasserlöslicher Stoffe. So sind von Bedeutung:

α) Bestimmung der löslichen Mineralstoffe. Hierzu kann der nach S. 836 erhaltene Trockenrückstand oder ein anderer, etwa 4–5 g des zu untersuchenden Stoffes entsprechender Teil der wäßrigen Lösung nach dem Eindampfen in einer geräumigen Platinschale auf dem Wasserbade verwendet werden. Näheres siehe S. 1209.

β) Bestimmung des löslichen Gesamt-Stickstoffes und der Stickstoffverbindungen. Zur Bestimmung des Gesamt-Stickstoffes wird ein Teil der wäßrigen Lösung — 2–5 g der ursprünglichen Substanz entsprechend — in einem KJELDAHL-Verbrennungskolben von 500–600 ccm Inhalt unter Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure direkt über kleiner Flamme bis auf 20–30 ccm eingekocht, darauf nach dem Erkalten mit 20 ccm KJELDAHL-Schwefelsäure versetzt und nach S. 575 weiter behandelt.

Sollen einzelne Stickstoffverbindungen besonders bestimmt werden, so werden diese in entsprechenden weiteren Anteilen des wäßrigen Auszuges nach den üblichen Verfahren bestimmt.

γ) Bestimmung der organischen Säuren. Die Bestimmung der freien organischen Säuren erfolgt nach den S. 1072–1168 angegebenen Verfahren.

## II. Nachweis und Bestimmung der Zuckerarten.

### A. Allgemeine Reaktionen auf Zucker<sup>1</sup>.

Versetzt man 0,5 ccm einer wäßrigen Zuckerlösung mit 1 Tropfen einer 10%igen Lösung von  $\alpha$ -Naphthol in acetonfreiem Alkohol und überschichtet mit 1 ccm konz. Schwefelsäure, so erhält man einen rotvioletten Ring; beim Umschütteln nimmt die Mischung eine violette Farbe an (Reaktion von MOHLISCH). Die Reaktion beruht auf Entstehung von Oxymethylfurfurol (vgl. S. 852), durch die Wirkung der starken Säure, das dann mit  $\alpha$ -Naphthol die Färbung liefert.

V. E. LEVINE<sup>2</sup> verwendet als Reagens eine 5%ige Lösung von Thymol in 95%igem Alkohol. Thymol hat gegenüber  $\alpha$ -Naphthol den Vorzug lichtbeständiger zu sein. Es spricht auf alle Stoffe an, die aldehydischen Charakters sind oder mit konz. Säure Aldehyde liefern. Die Empfindlichkeit ist die gleiche wie beim Reagens von MOHLISCH. Die Färbung ist tiefrot, mitunter mehr purpurfarbig.

Später haben V. E. LEVINE und A. M. HUBBELL<sup>3</sup> als Reagens auf reduzierende Kohlenhydrate eine Lösung von 2% Ammoniummetavanadat in 10%iger Natriumcarbonatlösung empfohlen. Bei der Neutralisation mit 1%iger Salzsäure nimmt die Lösung damit — infolge Reduktion des Metavanadats — eine charakteristische grüne Farbe an.

<sup>1</sup> Vgl. u. a. O. HAMMARSTEN: Lehrbuch der physiologischen Chemie, 9. Aufl., S. 166.

<sup>2</sup> V. E. LEVINE: Proceed. Soc. exper. Biol. a. Med. 1930, 27, 830–831; C. 1931, I, 322.

<sup>3</sup> V. E. LEVINE and A. M. HUBBELL: Proceed. Soc. exper. Biol. a. Med. 1930, 28, 199 bis 200; C. 1931, I, 1647.

Die Reaktion tritt unmittelbar ein mit Xylose, Arabinose, Rhamnose, Glucose, Glucosamin, Fructose, Galaktose, Mannose, Lactose, Maltose und Cellobiose, ferner nach vorausgegangener Säurehydrolyse mit Saccharose, Trehalose, Raffinose, Melezitose, Dextrin, Stärke, Insulin, Glykogen, Cellulose, verschiedenen Glucosiden, Saponin, Gummiarten, Mucin, Phrenosin und Nucleinsäure. Proteine stören nicht. Organische Säuren geben ebenfalls charakteristische Färbungen. Doch ist das Reagens gegen diese weit weniger empfindlich als gegen Kohlenhydrate.

Als empfindliches Reagens auf reduzierende Kohlenhydrate verwendet P. K. BOSE<sup>1</sup> o-Dinitrobenzol, indem er einen Tropfen der 1%igen Zuckerlösung, einen Tropfen einer 1%igen alkoholischen Lösung dieses Stoffes und 5 Tropfen 25%ige Natriumcarbonatlösung, mit Wasser auf 2 ccm gebracht, über kleiner Flamme erhitzt. Es entsteht durch Reduktion eine tiefviolette Lösung eines chinoiden Salzes. Die Empfindlichkeit beträgt im allgemeinen  $6 \cdot 10^{-6}$ , bei Arabinose  $3 \cdot 10^{-5}$ , bei Maltose  $10^{-3}$  g im ccm. Glykoside, nicht reduzierende Zucker, Zuckersäuren, Zuckeralkohole und 2,3,4,6-Tetramethylglucose reagieren nicht.

Eine weitere allgemeine Reaktion auf einfache Kohlenhydrate — nicht auf Stärke und Glykogen — geben O. BAUDISCH und H. J. DEUEL<sup>2</sup> an. Diese fanden, daß die Kohlenhydrate, z. B. 0,1 g Zucker in 100 ccm Wasser, beim Destillieren mit 5 g Natriumbicarbonat bis fast zur Trockne ein Destillat von süßlichem Geruch liefern, das den Ketonalkohol Acetol enthält. Gibt man zum Destillat 30 mg Orthoaminobenzaldehyd, in wenig Alkohol gelöst, und Kalilauge bis zur deutlichen alkalischen Reaktion, dampft auf freier Flamme bis auf ein Drittel ein, säuert nach dem Abkühlen mit Salzsäure an, und macht mit Natriumbicarbonat alkalisch, so erhält man eine deutlich blaue Fluorescenz. Das Acetol hat sich mit Orthoaminobenzaldehyd zu 3-Oxychinaldin kondensiert, eine Verbindung, die sich mit Äther ausziehen und in Nadeln erhalten läßt. Glucose lieferte schon mit 5 mg eine deutliche Reaktion, andere Zuckerarten mit 0,1—0,2 g.

Setzt man ferner zu einer Zuckerlösung  $\frac{1}{10}$  Volumen einer durch Auflösen von 4 g Seignettesalz in 100 Teilen 10%iger Natronlauge mit 2 g Wismutsubnitrat auf dem Wasserbade verrührten und filtrierten Lösung und kocht etwa 2 Minuten, so färbt sich die Flüssigkeit erst gelb, dann gelbbraun, zuletzt fast schwarz und setzt einen schwarzen Bodensatz ab (Reaktion von BÖTTGER-ALMÉN-NYLANDER). Auch alkalische Quecksilberlösungen (alkalische Quecksilbercyanidlösung nach KNAPP, alkalische Jodquecksilberkaliumlösung nach SACHSSE) sind zum Nachweis reduzierender Zucker vorgeschlagen worden, aber heute kaum noch gebräuchlich. Das gleiche gilt vom Zuckernachweis durch Kochung mit Kupfersulfat und Natronlauge (TROMMERSche Probe), die heute mit Recht durch die Kochung mit FEHLING'scher Lösung ersetzt ist. Bei dieser, die als eigentliches Reagens auf Zucker gilt und meist dazu verwendet wird, wird das Kupferhydroxyd durch Seignettesalz in Lösung gehalten.

## B. Nachweis einzelner Zucker in Gemischen.

### 1. Nachweis der Hexosen.

Beim Erhitzen mit starken Säuren liefern die Hexosen und die aus Hexosen aufgebauten Zucker im Gegensatz zu Pentosen und Pentosanen, die dabei Furfurol bilden (vgl. S. 855), Lävulinsäure  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ .

So kann man nach einer von TOLLENS und WEHMER stammenden Vorschrift 5—20 g Substanz mit 100 ccm Salzsäure von der Dichte 1,09—1,10 18 Stunden im Wasserbade am Rückflußkühler erhitzen und der durch Abfiltrieren und Abpressen gereinigten Lösung mit Äther die Lävulinsäure entziehen. Der nach Abdestillieren des Äthers verbleibende Rückstand wird destilliert, wobei die Lävulinsäure als Öl übergeht und durch wiederholte Destillation gereinigt werden kann. Sie bildet ein farbloses, über Schwefelsäure zu großen, zerfließlichen, rhombischen Blättern erstarrendes Öl, das sich leicht in Wasser, Alkohol

<sup>1</sup> P. K. BOSE: Zeitschr. analyt. Chem. 1932, 87, 110.

<sup>2</sup> O. BAUDISCH u. H. J. DEUEL: Journ. Amer. chem. Soc. 1922, 44, 1585—1587; Z. 1924, 48, 315.

und Äther löst; sie schmilzt bei 33°, destilliert unter gewöhnlichen Druck bei 239°, im Vakuum bei 157–160°.

Die Lävulinsäure liefert mit Jod und Natronlauge Jodoform. Charakteristisch sind ferner das Zinksalz  $Zn(C_5H_7O_3)_2$ , das man in weißen, in Wasser und Alkohol leichtlöslichen Nadeln, silberglänzenden Blättchen oder seiden-glänzenden Massen durch Sättigen der Säure mit Zinkoxyd und Umkrystallisieren aus starkem Alkohol erhält, ferner das Silbersalz  $AgC_5H_7O_3$ , ein beim Umsetzen des Zinksalzes mit Silbernitrat entstehender krystallinischer Niederschlag, der sich in heißem Wasser bei genügender Verdünnung löst und beim Erkalten in schönen sechseckigen Tafelchen mit den Winkeln 99,1° und 130,5° wieder ausscheidet. Es löst sich in 115 Teilen Wasser von 20°. Auch das auf Zusatz von Phenylhydrazin schon aus verdünnter wäßriger oder alkalischer Lösung ausfallende Lävulinsäurephenylhydrazon ist zum mikroskopischen Nachweis der Lävulinsäure geeignet, es bildet schöne monokline Tafeln.

Die in Wasser zu einer echten — nicht kolloiden — Lösung löslichen Hexosen und aus Hexosen aufgebauten Kohlenhydrate lassen sich je nach ihrer Löslichkeit in Alkohol, ihrem Verhalten gegen alkalische Kupferlösung, FEHLINGSche Lösung, gegen alkalische Jodlösung, im polarisierten Lichte, gegen Behandlung mit Alkalien oder starken Säuren nach folgender Übersicht unterscheiden. Berücksichtigt sind hierbei zunächst nur die wichtigsten Hexosen und die bei der Hydrolyse Hexosen liefernden Saccharide.

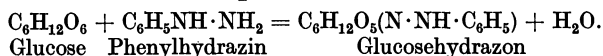
Tabelle 3. Übersicht über das Verhalten der wasserlöslichen Hexakohlenhydrate.

| Art der Behandlung                    | Monosaccharide   |                 |                 |                 |                 | Disaccharide                |                                    |                          |  |                        |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--|------------------------|
|                                       | d-Glucose        | d-Fructose      | d-Mannose       | d-Galaktose     | l-Sorbose       | Lactose                     | Maltose                            | Saccharose               | Dextrine   |                        |
| Löslichkeit in Alkohol                | löslich          | löslich         | löslich         | löslich         | —               | unlöslich                   | löslich                            | löslich                  | unlöslich  |                        |
| Konstitution                          | Aldose           | Ketose          | Aldose          | Aldose          | Ketose          | d-Glucose und d-Galaktose   | 2 d-Glucose                        | d-Glucose und d-Fructose | Poly-saccharide aus d-Glucose                              |                        |
| Formel                                | $C_6H_{12}O_6$   | $C_6H_{12}O_6$  | $C_6H_{12}O_6$  | $C_6H_{12}O_6$  | $C_6H_{12}O_6$  | $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$ | $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$        | $C_{12}H_{22}O_{11}$     | $(C_6H_{10}O_5)_n$   |                        |
| Schmelzpunkt                          | 146,5°           | 100°            | 132°            | 164°            | 165°            | 205°                        | 102° bis 103°                      | 160°                     | —  |                        |
| Spezifische Drehung $[\alpha]_D$      | + 52,3°          | — 94°           | + 14,0°         | + 81°           | 42,9°           | + 55,3°                     | + 137,5°                           | + 66,5°                  | stark rechts   |                        |
| Erhitzen mit alkalischer Kupferlösung | reduziert        | reduziert       | reduziert       | reduziert       | —               | reduziert                   | reduziert                          | reduziert nicht          | reduzieren schwer oder nicht                               |                        |
| Alkalische Jodlösung                  | reduziert        | reduziert nicht | reduziert       | reduziert       | —               | reduziert                   | reduziert                          | reduziert nicht          | reduziert nicht  |                        |
| Wird durch Erhitzen mit               | Alkalien         | zerstört        | zerstört        | zerstört        | zerstört        | —                           | zerstört                           | zerstört                 | nicht zerstört   | nicht zerstört         |
|                                       | stärkeren Säuren | nicht zerstört  | zerstört        | nicht zerstört  | nicht zerstört  | —                           | in Galaktose und Glucose gespalten | in Glucose gespalten     | in Glucose und Fructose gespalten, deren letztere zerstört | in Glucose gespalten   |
|                                       | schwachen Säuren | nicht gespalten | nicht gespalten | nicht gespalten | nicht gespalten | —                           | sehr langsam gespalten             | langsam gespalten        | in Glucose und Fructose (Invertzucker) gespalten           | sehr langsam gespalten |



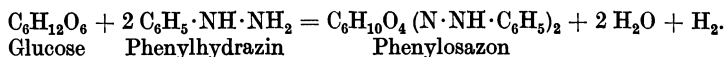
### a) Nachweis einzelner Hexosen durch Darstellung der Hydrazone und Osazone.

Als Aldehyde und Ketone besitzen die Hexosen und andere Monosen in konz. Lösung die Fähigkeit, sich mit Phenylhydrazin und anderen Hydrazinen unter Wasseraustritt zu den entsprechenden Hydrazonen zu verbinden:



Von diesen Hydrazonen sind die meisten durch gute Krystallisationsfähigkeit ausgezeichnet, einige auch von besonderer Schwerlöslichkeit in gewissen Lösungsmitteln.

Bei stärkerer Einwirkung von Phenylhydrazin im Überschuß und in der Wärme verbindet sich ein Molekül Monose mit 2 Molekülen Phenylhydrazin unter Freiwerden von Wasser zu einem Osazon:



Der entstehende Wasserstoff reduziert weiteres Hydrazin zu Anilin und Ammoniak. — Die Osazone sind gelb gefärbte krystallinische Körper.

Infolge der Entstehung von Nebenprodukten bei der Bildung der Osazone bei der höheren Temperatur, die sich durch wiederholte Krystallisation nur schwer vollständig entfernen lassen, ist der Identifizierungswert der Osazone für die einzelnen Zucker im allgemeinen geringer als der der Hydrazone. Auch die Schmelzpunkte sind weniger leicht erkennbar. Dazu kommt, daß Glucose, Fructose und Mannose dasselbe Osazon liefern.

Die Verwendung von Phenylhydrazin zur Identifizierung der Zuckerarten ist zuerst besonders durch die Arbeiten von E. FISCHER<sup>1</sup> über Hydrazone und Osazone gefördert worden. A. W. VAN DER HAAR<sup>2</sup> hat die Angaben über Bildungsweisen, Schmelzungspunkte, Eigenschaften und Identifizierungswert der Hydrazone für Monnosen kritisch nachgeprüft und zusammengestellt. Seinen Ausführungen, soweit nicht anderes angegeben ist, sind die folgenden Angaben entnommen. Nach VAN DER HAAR sind manche Derivate<sup>3</sup> des Phenylhydrazins diesem selbst durch Bildung geeigneter Hydrazone und Osazone überlegen.

Für den Nachweis der einzelnen Hexosen durch Darstellung der Hydrazone und Osazone sind vorzugsweise folgende Vorschriften zu empfehlen:

#### α) Glucose.

αα) Als p-Nitrophenylhydrazon nach W. A. VAN EKENSTEIN und J. J. BLANKSMA<sup>4</sup>: 0,25 g Glucose werden mit 3 ccm 96%igem Alkohol heiß gelöst, dann im Wasserbade mit 0,25 g p-Nitrophenylhydrazin erhitzt, bis alle Glucose umgesetzt ist. Das entstehende Hydrazon wird nach einigen Stunden auf einem Saugfilter gesammelt, mit Alkohol gewaschen und aus 95%igem Alkohol umkrystallisiert. Es bildet orangegelbe, glänzende Kryställchen, mikroskopisch langgestreckte Prismen, vom Schmp. 189°, die in Pyridin ziemlich leicht löslich sind.

ββ) Als p-Brombenzhydrazid nach R. KAHL<sup>5</sup>: 0,25 g Glucose werden mit 270 mg p-Brombenzhydrazin und 5 ccm 95%igem Alkohol 1/2 Stunde im

<sup>1</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1884, 17, 579 und weitere Arbeiten.

<sup>2</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der Monosaccharide und Aldehydsäuren, S. 144—227. Berlin 1920.

<sup>3</sup> Die Reagenzien werden von C. A. F. KAHLBAUM abgegeben.

<sup>4</sup> W. A. VAN EKENSTEIN u. J. J. BLANKSMA: Rec. Trav. chem. Pays-Bas 1903, 22, 434—439; vgl. A. RECLAIRE: Ber. Dtsch. chem. Ges. 1908, 41, 3665—3675.

<sup>5</sup> R. KAHL: Über die Paarung von Säurehydraziden mit Zuckerarten. Diss. Freiburg 1904.

Wasserbade erhitzt. Es scheidet sich bald das Glucose-Brombenzhydrazid aus, das in feinen Nadelchen krystallisiert und den Schmp. 201° zeigt.

$\gamma\gamma$ ) Als Phenyllosazon nach E. FISCHER: 0,25 g Glucose in 10 ccm Wasser werden mit 0,25 g salzsaurem Phenylhydrazin und 0,75 g Natriumacetat 1 Stunde im Wasserbade erhitzt. Nach 24 Stunden wird das abgeschiedene Osazon auf einem Saugfilter mit Wasser, in dem es unlöslich ist (aber nur in reinem Zustande!), gewaschen. Nach Lösung in 3 ccm siedendem 90%igem Alkohol wird mit 6 ccm Wasser verdünnt, wieder krystallisieren gelassen und dieses nochmals wiederholt. Dann wird das Osazon in Aceton gelöst, Wasser bis zur Trübung zugegeben, wieder krystallisieren gelassen, abgesogen und nochmals aus 30%igem Alkohol umkrystallisiert. Schließlich wird es in heißem 70%igem Alkohol gelöst, dann werden 4 ccm Wasser zugesetzt und das Osazon nochmals aus 30%igem Alkohol krystallisiert. Es bildet einen lichtgelben Körper vom Schmp. 210°.

Zur weiteren Identifizierung empfiehlt VAN DER HAAR das p-Bromphenyllosazon (Schmp. 215–216°) und p-Nitrophenyllosazon (Schmp. 252°). Über den Nachweis der Glucose durch Überführung in zuckersaures Silber vgl. S. 851.

### $\beta$ ) Fructose.

$\alpha\alpha$ ) Als o- und p-Nitrophenylhydrazon, das wie bei Glucose unter  $\alpha\alpha$ ) dargestellt wird. Die o-Verbindung bildet nach zweimaligem Umkrystallisieren aus 95%igem Alkohol citronengelbe Nadeln, die bei 156–157° schmelzen<sup>1</sup>. Die p-Verbindung besteht nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Alkohol aus prismatischen Nadeln vom Schmp. 180–181°.

$\beta\beta$ ) Als Phenyllosazon, wie bei Glucose unter  $\gamma\gamma$ ).

$\gamma\gamma$ ) Als Methylphenyllosazon (Schmp. 161–162°) und p-Nitrophenyllosazon (251°) nach VAN DER HAAR.

### $\gamma$ ) Galaktose.

$\alpha\alpha$ ) Als o-Tolyldhydrazon nach A. W. VAN DER HAAR<sup>2</sup>: Eine Lösung von 1 Teil Galaktose in 1 Teil Wasser wird mit einem Teil aus heißem Wasser frisch umkrystallisiertem o-Tolyldhydrazin in 20 Teilen absolutem Alkohol  $\frac{1}{2}$  Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt; das bald auskrystallisierende Hydrazon wird nach 24 Stunden abgesogen, mit Alkohol und Äther gewaschen und aus 95%igem Alkohol umkrystallisiert. Die erhaltenen farblosen, glänzenden, wolligen Nadelchen schmelzen nach Abwaschen mit Alkohol, dann mit Wasser, Alkohol und Äther bei 176°. — Diese von VAN DER HAAR gefundene Reaktion auf Galaktose ist spezifisch und empfindlich. Weder andere Hexosen und Pentosen, noch auch Glucuronsäure scheiden hierbei Krystalle ab.

$\beta\beta$ ) Als Benzoyldihydromethylketolhydrazon nach J. v. BRAUN<sup>3</sup>: Die salzsauren mit Natriumacetat versetzten Lösungen von Benzoyldihydromethylketolhydrazin scheiden mit Glucose, Fructose, Mannose, Arabinose und Xylose nichts ab, mit Galaktose farblose Krystalle vom Schmp. 181° (unter Aufschäumen), die in Alkohol auch in der Wärme kaum, in heißem Wasser etwas, in Pyridin leicht löslich sind.

Weiter empfiehlt VAN DER HAAR das  $\alpha$ -Methylphenylhydrazon (vgl. S. 859), p-, m- und o-Nitrophenylhydrazon (194° bzw. 181° bzw. 178°), Phenyllosazon (184°), Benzhydrazid (192–193°), p-Tolyldhydrazon (168°).

Über den Nachweis der Galaktose als Schleimsäure vgl. S. 854, durch Vergärung mit Lactosehefe S. 908.

<sup>1</sup> A. VAN EKENSTEIN u. BLANKSMA haben den Schmp. 162° angegeben.

<sup>2</sup> A. W. VAN DER HAAR: Rec. Trav. chim. Pays. Bas. 1917, **37**, 108–110 u. 215–253.

<sup>3</sup> J. v. BRAUN: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1916, **49**, 1266–1268; **Z.** 1917, **33**, 400.

## d) Mannose.

$\alpha\alpha$ ) Als Phenylhydrazon nach E. FISCHER<sup>1</sup>: 200 mg Mannose werden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 200 mg Phenylhydrazin in 400 mg 25%iger Essigsäure versetzt, worauf das schwerlösliche Hydrazon bald auskrystallisiert, das man aus Wasser und darauf aus 60%igem Alkohol umkrystallisiert. Es schmilzt bei 199° unter Aufbrausen. — Das Hydrazon ist in etwa 80—100 Teilen heißem Wasser, viel schwerer in Alkohol und Aceton, in Äther und Benzol wenig, leicht in heißem 60%igem Alkohol löslich.

$\beta\beta$ ) Als p-Tolyldhydrazon nach A. W. VAN DER HAAR<sup>2</sup>: Gleiche Teile Monosaccharid und p-Tolyldhydrazin werden mit 20 Teilen 96%igen Alkohols im Wasserbade erhitzt, bis alles Monosaccharid gelöst und umgesetzt ist (etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde nach der Lösung). Nach 24 Stunden wird gesammelt und ein oder mehrmals aus 96%igem Alkohol umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt wurde zu 190—191° gefunden.

$\gamma\gamma$ ) Zur weiteren Identifizierung empfiehlt VAN DER HAAR das p-Bromphenylhydrazon (Schmp. 208°), das  $\alpha$ -Methylhydrazon (181°), das Phenylsazon (210°), und das p-, m-, o-Nitrophenylhydrazon (202° bzw. 167° bzw. 171°).

Über die zweckmäßigste Arbeitsweise bei der Trennung und Identifizierung von Gruppen zweier und dreier Monosaccharide macht VAN DER HAAR in seinem Buche ausführliche Angaben, worauf hier verwiesen wird.

Wiedergewinnung der Saccharide aus den Hydrazonen. Aus den Hydrazonen können die Monosaccharide durch Benzaldehyd oder Formaldehyd in reiner Form wiedergewonnen werden. Zu diesem Zwecke erhitzen HERZFELD und DE WITT<sup>3</sup> 2 g des reinen Hydrazons 5 Stunden mit 1,6 g Benzaldehyd, 14 g 95%igem Alkohol und 10 g Wasser, schütteln das Filtrat vom auskrystallisierten Benzaldehydhydrazon nach Verdampfung des Alkohols dreimal mit Äther aus und dampfen die wäßrige Flüssigkeit zum Sirup ein, worauf das Monosaccharid auskrystallisiert. O. RUFF und G. OLLENDORFF<sup>4</sup> verwenden zur Zersetzung der Hydrazone 40%ige Formaldehydlösung, während BROWNE<sup>5</sup> hieraus folgende Arbeitsweise ableitete: 2 g Hydrazon werden mit 18 g 95%igem Alkohol und 1,5 g 40%iger Formaldehydlösung erhitzt und das Gemisch auf ein Drittel eingedampft. Dann wird noch 2 Stunden im Wasserbade am Rückfluß erhitzt und nach Zugabe von 10 ccm Wasser dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die wäßrige Flüssigkeit wird dann mehrmals nach jedesmaligem Zusatz von etwas absolutem Alkohol zur Entfernung des Aldehyds eingedampft und schließlich zum Krystallisieren hingestellt.

## b) Nachweis durch sonstige Reaktionen.

## a) Glucose neben anderen Sacchariden.

Das wichtigste Unterscheidungsmittel der Glucose von der Fructose und Saccharose bildet ihr Verhalten gegen alkalische Jodlösung, das auch zu ihrer Bestimmung dient (S. 890). Es unterscheidet die Glucose aber nicht von anderen Aldosen.

Das gleiche ist mit folgender von A. BERG<sup>6</sup> angegebener Farbreaktion auf Aldosen der Fall, bei der N. SCHOORL<sup>7</sup> als Einwaage statt 200—300 nur 20 bis 30 mg verwendet: 20—30 mg des Zuckers oder eine konz. Lösung davon werden mit 10 ccm frisch bereiteten Bromwasser auf 60—70° im Wasserbade erhitzt und dann der Bromüberschuß schnell fortgekocht. Setzt man nun

<sup>1</sup> E. FISCHER: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1887, **20**, 821.

<sup>2</sup> A. W. VAN DER HAAR: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1917, **36**, 346—351.

<sup>3</sup> HERZFELD u. DE WITT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1895, **28**, 442.

<sup>4</sup> O. RUFF u. G. OLLENDORFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, **32**, 3234—3237.

<sup>5</sup> BROWNE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, **35**, 1457—1467.

<sup>6</sup> A. BERG: Bull. Soc. chim. France 1904 (3), **31**, 1216—1217; C. 1905, I, 122.

<sup>7</sup> Nach VAN DER HAAR: Anleitung, S. 99.

zu der farblosen Flüssigkeit 10 ccm einer Ferrichloridlösung, die in 100 ccm 4 Tropfen einer Lösung von 3 g des krystallisierten Salzes in 1 g Wasser enthält, und 2 Tropfen 35%iger Salzsäure, so geben Glucose, Arabinose, Xylose und Galaktose eine starke Gelbfärbung. — VAN DER HAAR<sup>1</sup> erhielt bei der Nachprüfung der Reaktion bei Fructose nur eine sehr geringe Gelbfärbung, bei der Glucose eine starke. — Die Färbung wird durch Oxysäuren, entstanden aus den Aldosen, bedingt.

Eine weitere Farbreaktion auf Glucose, beruhend auf der Bildung von Indigoblau, hat B. KOHNSTEIN<sup>2</sup> angegeben: Die zu prüfende Flüssigkeit, bei starker Färbung nach Verdünnung mit Wasser, wird mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion und darauf mit etwa 0,05 g o-Nitrophenylpropionsäure versetzt und  $\frac{1}{4}$  Minute erwärmt. Bei Gegenwart von Glucose färbt sich die Flüssigkeit blau und setzt nach 2—3 Stunden Indigoblau als dichten blauen Niederschlag ab. — Bei gerbstoffreichen Flüssigkeiten empfiehlt sich vorheriges Schütteln mit frisch geglühtem Magnesiumoxyd. Stärke, Saccharose und Eiweiß sind ohne Einfluß auf das Reagens. — Das Indigoblau löst sich in Chloroform mit purpurroter, in Paraffin mit blauvioletter Farbe.

Die Zuckersäurereaktion auf Glucose. Diese von R. GANS und B. TOLLENS<sup>3</sup> angegebene, für Glucose (und Glucuronsäure) charakteristische Reaktion wird nach VAN DER HAAR<sup>4</sup> am besten wie folgt ausgeführt:

5 g oder weniger des Mono- oder Polysaccharids werden in einem Becherglase im siedenden Wasserbade mit der 12fachen Menge Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,15 zu einem dünnen Sirup (zu etwa 1 ccm) eingedampft und dies nach Zusatz von Wasser noch zweimal wiederholt. Dann wird in einem Porzellanschälchen unter fortwährendem Umrühren zur Sirupdicke eingedampft, über Nacht stehengelassen, wenn nötig, abgesogen (Schleimsäure) und mit wenig Wasser ausgewaschen. Nach Eindampfen zur Sirupdicke wird mit Kaliumcarbonat neutralisiert, mit Essigsäure angesäuert und nötigenfalls wieder etwas konzentriert. Nach nochmaligem Stehen über Nacht wird das gebildete saure zucker-saure Kalium von dem Rest der Mutterlauge befreit und dann zweimal aus heißem Wasser umkrystallisiert. Schließlich werden die Krystalle in Wasser gebracht, mit Ammoniak neutralisiert und die Zuckersäure mit einer 1%igen Silbernitratlösung unter Umrühren ausgefällt. Das neutrale Silbersalz wird mit Wasser gewaschen und dann über Schwefelsäure im Dunkeln völlig getrocknet. Dann wird darin durch einfache Veraschung eine Silberbestimmung ausgeführt, wobei 50,86% Silber gefunden werden sollen. — Neben diesem Silberwert ist auch die Krystallform — dicke nadelförmige Krystalle mit Trapezflächen — charakteristisch.

Über den Nachweis der Glucose neben reduzierenden Disacchariden mit BARFOEDS Reagens vgl. S. 858 und S. 900.

### β) Fructose neben anderen Hexosen.

#### αα) Durch Reduktion von Kupferlösungen.

Nach J. M. KOLTHOFF<sup>5</sup> eignen sich besonders folgende beiden Proben:

Reaktion von PIERAERTS<sup>6</sup>: Als Reagens wird entweder eine Lösung von 15 g Kupfersulfat, 140 g Kaliumcarbonat und 100 g Kaliumbicarbonat, mit Wasser auf 1 Liter gebracht, benutzt, oder man löst 12 g Glykokoll, 6 g Kupferhydroxyd und 50 g Kaliumcarbonat zum Liter.

10 ccm Reagens werden nach Mischung mit 1 ccm der zu prüfenden Zuckerlösung bei gewöhnlicher Temperatur  $1\frac{1}{2}$  Stunden, bei Gegenwart von Pentosen 1 Stunde stehengelassen. Eine Ausscheidung von Kupferoxydul, besonders am Boden des Reagensglases zu beobachten, zeigt Fructose an. — Noch etwa 5 mg, neben Glucose und Lactose, bzw. 2,5% Fructose, waren nachzuweisen, kleinere Mengen nicht mehr. Besonders mit dem zweiten Reagens wird nach PIERAERTS bei gewöhnlicher Temperatur in 12 Stunden nur Fructose reduziert.

<sup>1</sup> Nach VAN DER HAAR: Anleitung, S. 99.

<sup>2</sup> B. KOHNSTEIN: Collegium 1910, 301—304; Z. 1912, 23, 147.

<sup>3</sup> R. GANS u. B. TOLLENS: Liebigs Annalen 1888, 249, 219.

<sup>4</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung, S. 100.

<sup>5</sup> J. M. KOLTHOFF: Chem. Weekblad 1916, 13, 887—895; C. 1916 II 694.

<sup>6</sup> Nach KOLTHOFF. Eine ähnliche Reaktion gibt F. FISCHL (Chem.-Ztg. 1933, 57, 393) an.

Zu beachten ist, daß d-Glucuron- und d-Galakturonsäure ebenfalls, noch rascher als Fructose, reduzieren, was auch für die folgende Reaktion gilt.

A. W. VAN DER HAAR<sup>1</sup>, der die Reaktion neben Aldosen ebenfalls empfiehlt, beobachtete nach 24stündiger Einwirkung des Reagens bei Fructose eine ziemlich starke, bei Arabinose und Xylose eine schwache Abscheidung von Kupferoxydul, nach 2stündiger Einwirkung die Abscheidung nur bei Fructose.

Reaktion von STANLEY-BENEDICT<sup>2</sup>: 75–100 mg Zuckergemisch werden mit 5 ccm Reagens, das aus 17,3 g Kupfersulfat, 115 g Citronensäure und 500 g krystallisiertes Natriumcarbonat<sup>3</sup>, in Wasser zu 1 Liter gelöst, besteht, 30 Minuten auf 37–40° erwärmt. 1% Fructose war noch nachweisbar, während bei 0,5% die Reaktion unsicher wurde. Diese Reaktion ist also viel empfindlicher als die obige nach PIERAERTS. — Auch diese Reaktion wurde von VAN DER HAAR<sup>4</sup> nachgeprüft. Bei l-Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, Glucose, Mannose und Galaktose wurde keine Reaktion beobachtet, wohl aber mit Glucuronsäure.

Beide vorstehenden Reaktionen beruhen anscheinend darauf, daß unter dem Einflusse der Hydroxylionen unter den genannten Bedingungen die freie Fructose Spaltstücke von erhöhtem Reduktionspotential abspaltet (vgl. S. 860), die imstande sind, die Kupferlösung bereits in der Kälte zu Kupferoxydul zu reduzieren; sie sind auch bei Vorliegen von Saccharose anwendbar, nicht aber die folgenden, bei denen eine Inversion und damit ein Freiwerden von Fructose eintritt.

### ββ) Farbreaktionen der Fructose.

Die Farbreaktionen der Fructose beruhen darauf, daß sich aus ihr beim Erhitzen mit Säuren unter geeigneten Bedingungen viel leichter und viel mehr Oxymethylfurfurol bildet, als aus den anderen Hexosen, das dann mit Phenolen Färbungen liefert. Folgende Reaktionen werden besonders empfohlen:

Die Reaktion mit Resorcin und Salzsäure nach TH. SELIWANOFF<sup>5</sup> besteht darin, daß man den Zucker mit Salzsäure und Resorcin bis zu 15 Minuten im Wasserbade erhitzt, wobei die Gegenwart von Fructose bzw. Saccharose Rotfärbung hervorruft. J. PIERAERTS<sup>6</sup> erhielt aber ebenso wie früher KÖNIGSFELD<sup>7</sup> auch mit reiner Glucose Rotfärbung; als Grund hierfür nimmt A. JOLLES<sup>8</sup> eine Umlagerung der Glucose in Fructose oder wahrscheinlicher die Bildung eines anderen Stoffes an.

Viel zuverlässiger wird die Reaktion nach F. WEEHUIZEN<sup>9</sup>, wenn man statt der wäßrigen alkoholische Salzsäure in der Kälte einwirken läßt; das Reagens erhielt WEEHUIZEN durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in absoluten Alkohol unter Eiskühlung bis zur Sättigung. Die Lösung soll beim Anblasen rauchen. Die zu prüfende, zum Sirup eingedampfte wäßrige Lösung oder der feste Zucker werden mit 3–4 ccm der alkoholischen Salzsäure und 50 mg Resorcin gemischt, worauf in 3 Minuten durch Ketosen eine kirschrote Färbung entsteht. Nach VAN DER HAAR<sup>10</sup> ist diese Reaktion nicht nur außerordentlich

<sup>1</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung, S. 87. Berlin: Gebrüder Bornträger 1920.

<sup>2</sup> Siehe Fußnote 6, S. 851.

<sup>3</sup> In der Quelle steht: „Soda“.

<sup>4</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung, S. 88.

<sup>5</sup> TH. SELIWANOFF: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1887, **20**, 181.

<sup>6</sup> J. PIERAERTS: Bull. Assoc. Chimistes Sucr. Dist. 1908/09, **26**, 560–562; **Z.** 1910, **20**, 30.

<sup>7</sup> Nach KOLTHOFF, vgl. Anm. 6, S. 851.

<sup>8</sup> A. JOLLES: **Z.** 1913, **25**, 304–305.

<sup>9</sup> F. WEEHUIZEN: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1918, **37**, 302–303; **C.** 1918, II, 668 bis 669.

<sup>10</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 97.

scharf, und spezifisch für Ketosen, sondern in zweifelhaften Fällen, wenn andere versagen, ausschlaggebend; wenige Milligramm Fructose lieferten die Rotfärbung, Aldosen erst nach längerer Zeit. — WEEHUIZEN konnte mit dieser Reaktion noch 0,5% Saccharose in Milch nachweisen, wenn er 100 ccm Milch mit 30 ccm absolutem Alkohol schüttelte, filtrierte, 30 ccm Filtrat verdampfte und mit dem Rückstande die Reaktion anstellte.

Eine andere Ausführungsform der Reaktion hat R. OFNER<sup>1</sup> angegeben und festgestellt, daß 200 mg Glucose mit Resorcin etwa gleichstarke Rotfärbung liefern wie 1 mg Fructose. Um diese Störung durch Glucose vollständig auszuschalten, oxydiert C. J. KRUISHEER<sup>2</sup> vorhandene Aldosen vorher mit Hypojodit, reduziert den Jodüberschuß mit Natriumsulfit und fällt die Jodionen als Kupferjodür aus. Durch anschließende Ausschüttelung des bei der Reaktion entstehenden Farbstoffs mit Amylalkohol oder Phenol lassen sich so noch 0,002% Fructose neben 2% Glucose nachweisen.

Störungen durch Eigenfarbe der Versuchslösung schalten C. SAMPIETRO und K. TÄUFEL<sup>3</sup> durch Überdestillieren des beim Entstehen flüchtigen Oxymethylfurfurols mit Wasserdampf in die Reagenslösung aus und können so noch 1,5 mg Fructose einwandfrei erkennen.

Farbreaktionen nach E. PINOFF<sup>4</sup>: PINOFF hat im ganzen 6 Farbreaktionen angegeben, bei denen teils  $\alpha$ -Naphthol,  $\beta$ -Naphthol, Resorcin, teils Kaliumbichromat und Ammoniummolybdat<sup>5</sup> unter bestimmten Bedingungen verwendet werden. Von diesen empfiehlt VAN DER HAAR besonders die folgende: 50 mg der Saccharide werden mit 10 ccm Alkohol-Schwefelsäure (75 ccm + 20 ccm) und 0,2 ccm alkoholischer  $\alpha$ -Naphthollösung (5 g in 100 ccm 96%igem Alkohol) im Wasserbade auf 95–98° erhitzt. Tritt dann in höchstens 3 Minuten Violettfärbung ein, so ist die violette Farbe für Fructosen kennzeichnend. Glucose, Mannose, Galaktose, Arabinose, Xylose und Rhamnose lieferten die Färbung nicht. — C. REICHARD<sup>6</sup> führt die Prüfung mit  $\alpha$ -Naphthol bei fester Saccharose in besonderer Weise auf einer Glasplatte aus, worauf verwiesen sei.

Nach M. WAGENAAR<sup>7</sup> eignet sich  $\alpha$ -Naphthol auch zum Fructosenachweis auf mikroskopischem Wege: Man suspendiert die zu prüfende Substanz in einen Tropfen einer 2%igen Lösung von  $\alpha$ -Naphthol in Glycerin und gibt dann auf den Tropfen eine etwa gleiche Menge Schwefelsäure. Durch die eindringende Säure entsteht um das Ketoseteilchen eine schön blauviolette Umrandung, während Aldoseteilchen ungefärbt bleiben. — Kornblaue Färbungen können durch Verunreinigungen (Papierstückchen) verursacht sein.

Die Reaktion mit Diphenylamin-Salzsäure, zuerst von PECHMANN<sup>8</sup> und A. IHL<sup>9</sup> angegeben, wurde von A. JOLLES<sup>10</sup> verbessert. Nach JOLLES gibt man in ein Reagensglas 0,4 ccm einer 1%igen Lösung des zu prüfenden Zuckers, dazu 0,6 ccm Wasser, 10 Tropfen einer 20%igen alkoholischen Diphenylaminlösung und 1 ccm konz. Salzsäure und kocht die Mischung 1 Minute lang. Nach darauffolgendem langsamem Abkühlen äußert sich ein Fructosegehalt in einer Blaufärbung der Flüssigkeit. — A. W. VAN DER HAAR<sup>11</sup> erhitzt dagegen 50 mg Zucker, in 1 ccm Wasser gelöst, mit 0,5 ccm 20%iger alkoholischer Diphenylaminlösung und 1 ccm 25%iger Salzsäure 5 Minuten in siedendem Wasserbade (nach SCHOORL), beobachtet dann und erhitzt 5 Minuten weiter. VAN DER

<sup>1</sup> R. OFNER: Chem.-Ztg. 1929, **53**, 682.

<sup>2</sup> C. J. KRUISHEER: Rec. Trav. chim. Pays-Bas. 1932, **51**, 273.

<sup>3</sup> C. SAMPIETRO u. K. TÄUFEL: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, **92**, 241.

<sup>4</sup> E. PINOFF: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1905, **38**, 3308–3318; C. 1905, II, 1555–1556.

<sup>5</sup> Vgl. auch E. PINOFF u. K. GUDE: Chem.-Ztg. 1914, **38**, 625–626; Z. 1914, **38**, 625 bis 626.

<sup>6</sup> C. REICHARD: Pharm. Zentralh. 1910, **51**, 979–986; Z. 1912, **23**, 526–527.

<sup>7</sup> M. WAGENAAR: Pharm. Weekbl. 1933, **70**, 1029.

<sup>8</sup> PECHMANN: Ber. österr. Ges. Förderung chem. Ind. 1884, 106.

<sup>9</sup> A. IHL: Chem.-Ztg. 1885, **9**, 451.

<sup>10</sup> A. JOLLES: Apoth.-Ztg. 1909, 719.

<sup>11</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 98.

HAAR hält diese Reaktion für weniger überzeugend als die vorigen. S. ROTHENFUSSER<sup>1</sup> verwendet die Reaktion zum Nachweise von Saccharose neben Lactose in Milch, aber erst nach Ausfällung der Lactose mit Bleiacetat und Ammoniak. Diese Ausführungsform von ROTHENFUSSER ist, wie L. BENVENGNIN und E. CAPT<sup>2</sup> bestätigen, außerordentlich scharf. H. T. B. RASMUSSEN<sup>3</sup> fand, daß alle Hexosen in 1 ccm Lösung, mit 16–20 Tropfen alkoholischer 10%iger Diphenylaminlösung und 1 ccm konz. Salzsäure gekocht und mit Äther ausgeschüttelt, in 35–100 Sekunden mehr oder weniger Blaufärbungen lieferten, allerdings Ketosen schneller als Aldosen. J. FIEHE und W. KORDATZKI<sup>4</sup> verwenden die Reaktion nach JOLLES zum Nachweise von Fructose-dextrin in Honig und Kunsthonig.

Die Reaktion von G. P. PLAISANCE<sup>5</sup> ist gleichzeitig eine Fällungsreaktion; sie beruht auf Bildung eines schwerlöslichen gelben Kondensationsproduktes des Oxymethylfurfurols mit Thiobarbitursäure: Der zu prüfende Stoff wird im Reagensglase mit 12%iger Salzsäure bis zum beginnenden Sieden erhitzt, dann abgekühlt und mit einigen Tropfen einer Lösung von Thiobarbitursäure in 12%iger Salzsäure versetzt. Bei Gegenwart einer Keto-hexose bildet sich beim Stehen ein orangegelber Niederschlag, durch Aldosen mitunter eine gelbe Lösung, aber kein Niederschlag.

Fructose in Substanz kann nach L. EKKERT<sup>6</sup> auch an der mit Ätzkali eintretenden Rotfärbung erkannt werden: In eine kleine Porzellanschale bringt man 10–30 mg Fructosepulver, dazu 3–5 Tropfen etwa 2 N.-Kalilauge oder Natronlauge sowie 0,5–1 g festes Ätzkali. Nach einer halben Stunde zeigt sich dann um das Stück Ätzkali eine rötliche, schließlich die ganze Flüssigkeit färbende blutrote Farbe. — Andere Zuckerarten werden gelb oder bleiben farblos.

Sonstige Nachweismethoden. Die S. 892–895 für die Bestimmung der Fructose neben anderen Zuckerarten angegebenen quantitativen Verfahren sind zu ihrem qualitativen Nachweis ebenfalls geeignet. Insbesondere die Reduktionswirkung von mit alkalischer Jodlösung oxydierter Zuckerlösung gegen FEHLINGSche Lösung nach Beseitigung des Jodüberschusses durch Natriumsulfit in der Arbeitsweise nach KOLTHOFF bildet ein ausgezeichnetes Mittel zur Erkennung von freier Fructose bzw. von anderen Ketosen.

### γ) Galaktose.

Die Galaktose wird außer als Hydrazon nach S. 849 am sichersten nach der Schleimsäurereaktion von W. H. KENT<sup>7</sup> und B. TOLLENS<sup>8</sup> erkannt. Die Reaktion hat auch besonderen Wert zum Nachweise des Milchzuckers neben anderen Zuckerarten, so nach J. GROSSFELD<sup>9</sup> zum Milchnachweis in Backwaren. Zur Ausführung der Prüfung kann man bis zu etwa 5 g des Zuckers mit 30 ccm Salpetersäure (Dichte 1,15) auf dem Wasserbade auf etwa 10 ccm eindampfen und dann mehrere Tage kühl stehengelassen. Die als feiner Niederschlag abgeschiedene Schleimsäure wird abfiltriert und auf den Schmelzpunkt geprüft, der 212–213° beträgt. Nötigenfalls wird so oft umkrystallisiert, bis dieser Schmelzpunkt erreicht ist.

Zur weiteren Identifizierung kann man nach VAN DER HAAR die Krystalle in etwas verdünnter Natronlauge lösen und nach Ansäuern mit Salzsäure wieder

<sup>1</sup> S. ROTHENFUSSER: Z. 1909, 18, 135–155; 1910, 19, 665–675.

<sup>2</sup> L. BENVENGNIN u. E. CAPT: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 267.

<sup>3</sup> H. T. B. RASMUSSEN: Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 1913, 23, 379–382; Z. 1915, 29, 35.

<sup>4</sup> J. FIEHE u. W. KORDATZKI: Z. 1928, 55, 602–608.

<sup>5</sup> G. P. PLAISANCE: Journ. Biol. Chem. 1917, 29, 207–208; C. 1917, II, 777.

<sup>6</sup> L. EKKERT: Ber. Ungar. Pharm. Ges. 1929, 5, 17; Z. 1933, 65, 235.

<sup>7</sup> W. H. KENT: Diss. Göttingen 1884.

<sup>8</sup> B. TOLLENS: Liebigs Annalen 1886, 232, 186.

<sup>9</sup> J. GROSSFELD: Z. 1918, 35, 457.

krystallisieren lassen. Man erhält dann oft Prismen, die schief abgeschnitten sind, aber so wenig, daß sie fast als Rechtecke erscheinen können. VAN DER HAAR neutralisiert ferner eine kleine Menge der Schleimsäure in einem Wassertropfen auf einem Objektträger mit Ammoniak und bewegt dann darin ein Körnchen Thalliumnitrat hin und her, wodurch eine reichliche Abscheidung rechteckiger Stäbchen eintritt.

Nach Versuchen von GROSSFELD versagt die Schleimsäureprobe in der obigen einfachen Form beim Milchzuckernachweis, z. B. in Backwaren, wenn neben Milchzucker viel anderer Zucker vorliegt, so z. B. bei Zuckergebäck, da dann die Krystallisation ausbleiben kann. In solchen Fällen gelingt der Nachweis oft noch nach Anreicherung der Lactose durch fraktionierte Fällung durch Alkohol-Äther.

Über die quantitative Bestimmung der Galaktose mittels der Schleimsäureprobe vgl. S. 903.

## 2. Nachweis von Pentosen.

### a) Nachweis der Pentosen durch Farbreaktionen.

Die Farbreaktionen der Pentosen beruhen fast alle darauf, daß beim Erhitzen mit Salzsäure Furfurol (bzw. aus den Methylpentosen Methylfurfurol) frei wird, das dann mit geeigneten Reagenzien den charakteristischen Farbstoff bildet. Im Vergleich dazu spalten die Hexosen unter gleichen Bedingungen Oxymethylfurfurol ab, das entweder keine oder andere Farbstoffe liefert und damit die Unterscheidung ermöglicht.

Die durch die Pentosen bedingten Färbungen sind durch besondere Absorptionsspektren ausgezeichnet, die für die Beurteilung von außerordentlichem Werte sind.

Nach A. W. VAN DER HAAR<sup>1</sup> unterscheidet man:

α) Farbreaktionen, die Pentosen (einschließlich Glucuronsäure, Galakturonsäure und Aldehydschleimsäuren) und Methylpentosen geben. Die Orzinreaktion nach BIAL ist als Vorprobe besonders geeignet, sehr empfindlich gegen Pentosen, weniger gegen Methylpentosen.

β) Farbreaktionen, die nur Pentosen (einschließlich der drei genannten Säuren) geben.

Die Phloroglucinreaktion nach WHEELER und TOLLENS. Diese ist für Pentosen sehr empfindlich, verringert durch ungünstige Mengen Hexosen; Methylpentosen verschieben den Farbton nach Rot.

Die Resorcinreaktion nach BAEYER in der Ausführung nach ROSENTHALER. — Für Pentosen empfindlich und charakteristisch. Größere Mengen Methylpentosen stören mehr als Hexosen.

Die Reaktion nach SCHIFF mit Anilin und Eisessig ist empfindlich und charakteristisch; sie soll mit kleinen Zuckermengen ausgeführt werden.

γ) Farbreaktionen, die nur Methylpentosen geben.

Die Reaktion mit Aceton nach ROSENTHALER ist empfindlich und bei sorgfältiger Ausführung charakteristisch.

Die Reaktion nach WIDTSOE. — Bei Gegenwart von Nicht-Methylpentosen ist die Empfindlichkeit verringert, die Reaktion bleibt aber charakteristisch.

Außer den genannten sind noch weitere Farbreaktionen vorgeschlagen worden, die sich aber bei der Nachprüfung durch VAN DER HAAR als weniger zuverlässig erwiesen haben. H. ASPELUND und F. W. KLINGSTEDT<sup>2</sup> empfehlen als Reagens m-Xylidin, das unter gewissen, in der Quelle angegebenen Bedingungen mit Furfurol, nicht aber mit Oxymethylfurfurol Rotfärbung gibt.

<sup>1</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung, S. 36—58.

<sup>2</sup> H. ASPELUND u. F. W. KLINGSTEDT: Pappers-Trävarutidskr. Finland 1933. 682; C. 1934 I, 314.



Die Ausführung der genannten Reaktionen geschieht, wie folgt:

Orzinreaktion nach M. BIAL<sup>1</sup>. Als Reagens dient eine Lösung von 1 g Orzin in 500 ccm 25%iger Salzsäure unter Zusatz von 1,5 ccm 10%iger Ferrichloridlösung<sup>2</sup>. Der zu prüfenden Pentosenlösung mit höchstens 25 mg Pentosen in Wasser wird soviel Reagens zugegeben, bis die Mischung etwa 18% Salzsäure enthält und einige Minuten gekocht. Bei Gegenwart von Pentosen färbt sie sich blaugrün bis blau, eine Farbe, die bei Schütteln mit Amylalkohol in diesen übergeht. Mit Methylpentosen tritt eine schwächere, mehr grüne, bald in Braungrün übergehende Farbe ein. Die Pentosen erzeugen 2 Banden im Spektroskop, von denen die stärkere die rote Lithiumlinie bedeckt und eine schwächere links von der roten Strontiumlinie liegt. Die Methylpentosen erzeugen nur eine Bande, die ungefähr mit der stärksten Pentosenbande zusammenfällt. Hexosen rufen nur eine schwach grünliche Farbe ohne eine charakteristische Bande hervor.

Phloroglucinreaktion nach H. J. WHEELER und B. TOLLENS<sup>3</sup>. Die Zuckerlösung wird mit konz. Salzsäure auf einen Salzsäuregehalt von etwa 18% gebracht, dann etwas Phloroglucin hinzugefügt und einige Minuten oder weniger im siedenden Wasserbade erhitzt. Der gegebenenfalls entstandene violettrote Farbstoff wird sofort mit reinem, furfurolfreiem Amylalkohol ausgeschüttelt, diese Lösung, nötigenfalls verdünnt, und im Spektrum geprüft. Bei Pentosen beobachtet man eine charakteristische Bande zwischen der Natrium- und Thalliumlinie. — E. PINOFF<sup>4</sup> konnte bei Ausführung der Reaktion in alkoholischer Lösung unter Zusatz von Äther die rote Farbe und die rote Bande wochenlang erhalten.

Bei der Resorcinreaktion von A. VON BAEYER<sup>5</sup> wird der zu prüfende Stoff wie bei der Pentosanbestimmung (vgl. S. 928) destilliert, jedoch mit der Abänderung, daß mit 30 ccm 12%iger Salzsäure und unter jedesmaliger Zugabe von 5 ccm 12%iger Salzsäure neunmal je 5 ccm und zuletzt 10 ccm abdestilliert werden. Die erhaltenen Destillate werden mit dem gleichen Volumen Salzsäure und einer kleinen Menge Resorcin versetzt und dann einige Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt. Beim Vorliegen von Pentosen werden grüne bis violettblaue Färbungen mit einem Streifen zwischen der roten Lithium- und Strontiumlinie, einer schwächeren auf der Natriumlinie erhalten. — Methylpentosen erzeugen lichtrote Färbungen und eine Bande etwa zwischen der grünen Thallium- und der blauen Caesiumlinie, die aber nach einigen Minuten beim Erwärmen verschwindet, während die Pentosenbanden bestehen bleiben.

Bei der Reaktion nach H. SCHIFF<sup>6</sup> werden einer Mischung gleicher Teile Anilin und Eisessig einige Tropfen furfurolhaltiger Flüssigkeit (durch Destillation wie bei 3. erhalten) zugesetzt, wodurch eine rote Färbung entsteht; Methylfurfurol liefert eine Gelbfärbung.

Reaktion mit Aceton nach L. ROSENTHALER<sup>7</sup> auf Methylpentosen. Beim Erhitzen einer Methylpentose mit 10 ccm 38%iger Salzsäure und 1–2 ccm reinem Aceton im siedenden Wasserbade entsteht bald eine himbeerrote (nach VAN DER HAAR violette) Färbung mit einer Bande, die die Natriumlinie

<sup>1</sup> M. BIAL: Deutsch. med. Wschr. 1902, 28, 253–254. — Eine Abänderung der Reaktion hat J. PIERAERTS (Bull. Assoc. chim. Sucr. et Distill. 1908/09, 26, 584; Z. 1910, 20, 94) angegeben.

<sup>2</sup> Vgl. auch E. MERCK: Reagenzienverzeichnis, 1929, S. 49.

<sup>3</sup> H. J. WHEELER u. B. TOLLENS: Liebigs Annalen 1889, 254, 329.

<sup>4</sup> E. PINOFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 766. — Vgl. auch PINOFF u. K. GUDE: Chem.-Ztg. 1913, 37, 621; Z. 1915, 29, 43.

<sup>5</sup> A. v. BAEYER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1872, 5, 6, 280.

<sup>6</sup> H. SCHIFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1887, 20, 540; Liebigs Annalen 1880, 201, 355.

<sup>7</sup> L. ROSENTHALER: Zeitschr. analyt. Chem. 1909, 48, 167.

bedeckt. Ist die violette Farbe zu stark, so kann mit Eisessig verdünnt werden. — Die Auswertung dieser Reaktion erfordert eine besondere Sorgfalt, weil auch Pentosen einen Streifen erzeugen, welcher sich der Methylpentosenbande nach Grün hin anschließt. Wird nun aber nach 3—5 Minuten langem Erwärmen abgekühlt und dann 30—60 Minuten stehen gelassen, so verschwindet die Pentosenbande, während die Methylpentosenbande noch deutlich sichtbar bleibt.

Bei der Reaktion nach J. A. WIDTSOE<sup>1</sup> werden 1—3 g des methylpentosenhaltigen Stoffes wie bei der Pentosanbestimmung (S. 928) destilliert. Von je 30 ccm Destillat werden 5—10 ccm in einem Reagenrohr erwärmt und nach Zugabe gleicher Teile 38%iger Salzsäure einige Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt. — Nur bei Methylpentosen beobachtet man eine Bande zwischen Grün und Blau.

Über den Nachweis der Glucuron-, Galakturon- und Aldehydschleimsäure vgl. S. 955.

### b) Nachweis der einzelnen Pentosen.

α) Der Nachweis der Arabinose gelingt nach A. W. VAN DER HAAR<sup>2</sup> am besten als α-Benzylphenylhydrazon, Diphenylhydrazon, p-Bromphenylhydrazon, α-Methylphenylhydrazon und Benzhydrazid.

Die Hydrazone wurden, wie folgt, dargestellt:

Arabinose-α-Benzylphenylhydrazon. 0,5 g Arabinose in 4 ccm 75%igem Alkohol werden mit 700 mg des Hydrazins in 2 ccm 75%igem Alkohol schwach erwärmt, worauf die Flüssigkeit bald krystallinisch erstarrt. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Alkohol gleicher Stärke werden farblose Nadelchen vom Schmp. 174<sup>o</sup> erhalten.

Arabinose-Diphenylhydrazon. Nach A. MÜTHER und B. TOLLENS<sup>3</sup> behandelt man eine Lösung von 0,25 g Arabinose in 1,5 ccm Wasser mit 0,2 g Diphenylhydrazin und Alkohol bis zur klaren Lösung, worauf sich nach einer Stunde das Hydrazon in Form farbloser Nadelchen vom Schmp. 199<sup>o</sup> (nach Umkrystallisieren) abscheidet<sup>4</sup>. — Über Bestimmung der Arabinose als Diphenylhydrazon vgl. S. 883.

Arabinose-p-Bromphenylhydrazon. Nach E. FISCHER<sup>5</sup> werden 500 mg Arabinose in 6 ccm Wasser mit einer filtrierten Lösung von 1 g des Hydrazins in 12 ccm Wasser + 3,5 ccm 50%iger Essigsäure gemischt. Nach einigen Stunden wird abgesogen, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und aus 50%igem Alkohol umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt des Hydrazons ist 168<sup>o</sup>.

Das α-Methylphenylhydrazon der Arabinose wird ähnlich wie das Diphenylhydrazon (vgl. oben) erhalten. Der Schmelzpunkt beträgt 165<sup>o</sup>.

Zur Darstellung des Arabinose-Benzhydrazids löst VAN DER HAAR<sup>6</sup> 0,25 g Arabinose in 3 ccm Wasser und gibt 0,25 g des Hydrazins hinzu. Nach allmählichem Verschwinden des Hydrazins krystallisiert das Hydrazid aus, dessen Schmelzpunkt nach mehrmaligem Umkrystallisieren 207<sup>o</sup> betrug. — Bei den übrigen Monosacchariden entstand in 2 Tagen kein Hydrazid, bei Rhamnose nach 3 Tagen. — Bei Ausführung der Reaktion in Alkohol wurde ein bei 212<sup>o</sup> schmelzendes Hydrazid erhalten.

<sup>1</sup> J. A. WIDTSOE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1900, **33**, 146 und Diss. Göttingen 1899.

<sup>2</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 238.

<sup>3</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 163 und 178.

<sup>4</sup> Der von MÜTHER u. TOLLENS angegebene Schmelzpunkt von 204<sup>o</sup> ist nicht leicht zu erreichen.

<sup>5</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 153.

<sup>6</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 197.

$\beta$ ) Für den Nachweis der **Xylose** empfiehlt VAN DER HAAR neben dem m-Nitrophenylhydrazon (Schmp. 163<sup>0</sup>) und dem Osazon (Schmp. 163<sup>0</sup>), die ähnlich, wie bei den Hexosen (S. 848) beschrieben ist, dargestellt werden, als besonders charakteristisch die Xylonsäurereaktion nach G. BERTRAND<sup>1</sup>. Diese Reaktion beruht auf der Bildung von wetzsteinförmigen (bootförmigen) Krystallen der Doppelverbindung Cadmiumxylonat - Cadmiumbromid. Nach der verbesserten Vorschrift von J. A. WIDTSÖE und B. TOLLENS<sup>1</sup> werden 200 mg Xylose oder auf Xylose zu prüfendes Gemisch im Reagenzrohr in 1 ccm Wasser gelöst, mit 500 mg Cadmiumcarbonat gemischt und mit 7—8 Tropfen Brom schwach erwärmt. Nach Stehenlassen für 8—12 Stunden verdampft man fast zur Trockne, nimmt den Rückstand in 4—5 ccm Wasser auf, filtriert, dampft das Filtrat auf etwa 1 ccm ein, und mischt mit 1 ccm absolutem Alkohol. Nach einiger Zeit werden die ausgeschiedenen Krystalle unter dem Mikroskop geprüft. Nur wetzsteinförmige (bootförmige) Krystalle sind beweisend für Xylose.

Rhamnose liefert federförmige, weil kreuzweise verwachsene Krystalle, Galaktose Nadelchen, auch breitere, Mannose, Glucose und Arabinose ergeben wenig Nadelchen.

### 3. Nachweis von Di- und Trisacchariden.

#### a) Saccharose.

Saccharose zerfällt durch kurzes Erhitzen in saurer Lösung in Glucose und Fructose, von denen besonders letztere nach S. 851—854 leicht erkannt wird. Außerdem treten alle nach S. 852 in saurer Lösung ausgeführten Reaktionen auf Fructose auch mit Saccharose ein. Schließlich sind alle zur Bestimmung der Saccharose dienenden Methoden (vgl. S. 883—890) in entsprechend vereinfachter Form auch zu ihrem Nachweis geeignet.

#### b) Lactose (Milchzucker).

$\alpha$ ) Indirekter Nachweis mit BARFOEDS Reagens. Zur Feststellung, ob in einer Zuckerlösung, die FEHLINGSche Lösung reduziert, die Reduktion durch Lactose oder andere Zuckerarten bedingt ist, dient die BARFOEDSche Lösung, die durch Lösen von 10 ccm Eisessig, 66,5 g Kupferacetat und 7 g Natriumacetat in Wasser und Auffüllen auf 1000 ccm bereitet wird. Vermischt man 2 ccm einer Zuckerlösung, die etwa 1—3 mg Zucker enthält, mit 2 ccm dieser Kupferlösung, und hält 6,5 Minuten im siedenden Wasserbade, so wird nach O. SVANBERG<sup>2</sup> Glucose etwa 100mal so stark reduziert wie Lactose. Eine stärkere Reduktion zeigt also andere Zuckerarten an, während ein Ausbleiben der Reduktion, aber ihr Eintreten mit FEHLINGScher Lösung auf Lactose (oder Maltose vgl. S. 900) hindeutet.

$\beta$ ) Da die Lactose bei der Hydrolyse in Glucose und Galaktose zerfällt, kann durch Nachweis letzterer, sei es durch die Schleimsäureprobe (S. 903) oder nach der Gärmethode S. 902 u. 907, die Lactose ebenfalls erkannt werden, wenn andere Galaktose liefernde Stoffe (Raffinose, Schleimstoffe, Pektinstoffe) nicht zugegen sind. Bei Gegenwart von viel anderem Zucker neben wenig Lactose empfiehlt es sich, diese zunächst anzureichern, was nach Versuchen von GROSSFELD<sup>3</sup> bis zu einem gewissen Grade durch fraktionierte Fällung mit Alkohol und Äther gelingt.

#### c) Raffinose.

Die Raffinose ( $C_{18}H_{32}O_{16} + 5 H_2O$ ), die sich bei der Entzuckerung von Melassen durch Strontianit im Niederschlag anreichert und daher in

<sup>1</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 58.

<sup>2</sup> O. SVANBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, 188, 219—224; C. 1930, II, 1412.

<sup>3</sup> J. GROSSFELD: Z. 1918, 35, 457.

Strontianmelassen, wie sie bei der Raffinierung des Strontianzuckers abfallen (sog. Hildesheimer Sirup) in größerer Menge enthalten ist<sup>1</sup>, kann bei Zusätzen solcher Melassen zu Lebensmitteln in diese gelangen und unter Umständen zur Erkennung derartiger Verfälschungen dienen. Für den Nachweis der Raffinose, die aus je 1 Molekül Fructose, Glucose und Galaktose aufgebaut ist, kommt in Frage:

#### α) Die Polarisation.

Das Verfahren kommt besonders für Zuckerabläufe in Betracht. Die Raffinose dreht 1,852mal so stark nach rechts wie Saccharose und bleibt auch nach der Inversion noch rechtsdrehend. A. HERZFELD und J. DAMMÜLLER<sup>2</sup> haben Vorschriften zur Bestimmung und Berechnung der Raffinose bei Zuckerabläufen angegeben (Bd. V).

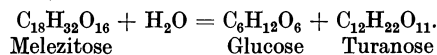
#### β) Der Nachweis der Galaktose.

αα) Die Schleimsäureprobe kann nach S. 854 oder 903 ausgeführt werden. Bei der Ausrechnung entspricht je 1 g Galaktose 3 g Raffinose.

ββ) Der Nachweis als Methylphenylhydrazon (vgl. auch S. 849). B. OFNER<sup>3</sup> schüttelt 50 g des zu untersuchenden Zuckers zwecks Anreicherung der Raffinose mit 150 ccm Methylalkohol und einigen Tropfen Kalialaunlösung 15 Minuten, filtriert und wäscht mit Methylalkohol nach. Das Filtrat wird zum Sirup eingedampft und dann mit 50 ccm 3%iger Schwefelsäure in einem Kolben von 150–200 ccm Inhalt unter Verschluss mit einer Glaskugel 3 Stunden im kochenden Wasserbade erhitzt. Die heiße Lösung wird mit Bariumcarbonat neutralisiert, mit Blutkohle entfärbt, filtriert, das Filtrat zur Hälfte eingedampft, mit dem doppelten Volumen 96%igem Methylalkohol und 1 ccm reinem asymmetrischem Methylphenylhydrazin (ausreichend für 4 g Raffinose) versetzt und eine halbe Stunde am Rückflußkühler auf dem Wasserbade gekocht. Die Lösung wird nochmals mit Blutkohle behandelt, und in ein Becherglas filtriert. Beim Abkühlen, das man durch Einstellen in eine Kältemischung unterstützen kann<sup>4</sup>, scheiden sich die weißen seideglänzenden Hydrazonkrystalle ab, deren Schmelzpunkt 180–183° beträgt. VAN DER HAAR gibt dafür 190° an.

#### d) Melezitose.

Die Melezitose kann nach Angaben von F. E. NOTTBOHM und F. LUCIUS<sup>5</sup> als gelegentlicher Bestandteil des Honigs (Blattlaushonigs) auftreten. Sie krystallisiert aus Wasser als  $C_{18}H_{32}O_{16} + 2H_2O$ . Wasserfrei erhält man sie durch Trocknen bei 100° oder Fällen mit starkem Alkohol. Der Zucker ist ein Trisaccharid und zerfällt beim Erwärmen mit 1%iger Schwefelsäure ziemlich leicht in Glucose und Turanose, wobei die spezifische Drehung von + 88,55° (vgl. S. 877) auf etwa + 63° abnimmt:



Die bei schwacher Inversion der Melezitose nach vorstehender Gleichung entstehende Turanose wird dabei bereits in geringem Maße (v. FELLEBERG<sup>6</sup>), völlig aber durch starke Inversion invertiert, wodurch die spezifische Drehung der Zuckermischung weiter sinkt. NOTTBOHM und LUCIUS, sowie v. FELLEBERG

<sup>1</sup> Vgl. W. SUTTHOFF u. J. GROSSFELD: Z. 1914, 27, 183.

<sup>2</sup> A. HERZFELD u. J. DAMMÜLLER: Zeitschr. Deutsch. Vereins d. Rübenzuckerind. 1889, 722–742; ebendort 1890.

<sup>3</sup> B. OFNER: Zeitschr. Zuckerind. Böhmen 1907, 31, 326; Z. 1908, 16, 180.

<sup>4</sup> Auch ein Einimpfen eines Kryställchens des Hydrazons, sowie Reiben mit dem Glasstabe unterstützt die Reaktion.

<sup>5</sup> F. E. NOTTBOHM u. F. LUCIUS: Z. 1929, 57, 549.

<sup>6</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1933, 24, 376.

haben dann weiter gezeigt, daß die Turanose aus je einem Molekül Glucose und Fructose aufgebaut ist.

Zur Gewinnung der Melezitose aus Honig, in dem sich das Vorhandensein des Zuckers durch eine graue Sedimentierung angezeigt hatte, verfahren sie wie folgt:

Der flüssige Anteil des Honigs wurde möglichst vollständig vom Bodensatz abgeseigt, der Rückstand mit wenig Wasser gut verrührt und auf einem BÜCHNER-Trichter gesammelt. Der Krystallbrei wurde dann mit wenig Wasser nachgewaschen, um die Dextrine so gut wie möglich zu entfernen. Der Rohzucker wurde mit wenig heißem Wasser aufgenommen und mit der 20fachen Menge heißen Alkohols versetzt, sowie von geringen Mengen noch ausfallender grauschwarzer Dextrine abfiltriert. Das Filtrat wurde zur Sirupkonsistenz eingedampft, mit wenig Wasser verdünnt und mit heißem Alkohol bis zur Trübung versetzt. Beim Erkalten schieden sich die Krystalle teils blättchenförmig, teils in rhombischen Prismen ab.

Nach v. FELENBERG ist Melezitose ebenso wie Saccharose (vgl. S. 884) gegen verdünnte Alkalien in der Hitze beständig und reduziert weder FEHLINGSche Lösung noch alkalische Jodlösung.

NOTTBOHM und LUCIUS stellten auch das Osazon der Turanose dar, das bei 215–217° schmolz.

#### e) Trifruktosan.

Dieses Trisaccharid, ein Trifruktoseanhydrid ( $C_{18}H_{30}O_{15}$ ), wurde von J. TILLMANS, H. HOLL und L. JARIWALA<sup>1</sup> aus Roggenmehlauszügen als in 70%igem Alkohol schwerlösliches Natriumsalz abgeschieden. Es zeigte die spezifische Drehung von  $-43,93^{\circ}$ , nach Inversion  $-92,70^{\circ}$ . Das Kohlenhydrat kann zum Nachweise von Roggenmehl in Weizenmehl verwendet werden. Doch scheint nach den Versuchen von KRUISHEER (S. 899) auch Weizen das gleiche oder ein ähnliches Fructosan in kleinen Mengen zu enthalten.

Über die Bestimmung von Fructosanen allgemein vgl. ebendort.

## C. Bestimmung der Hexosen.

### Zuckerbestimmung durch Reduktionsmethoden.

Die analytisch wichtigste allgemeine Eigenschaft der eigentlichen Zuckerarten liegt in ihrer Fähigkeit — sei es unmittelbar, sei es nach Hydrolyse — durch kurzes Erhitzen mit Säuren oder durch Enzyme (Inversion)<sup>2</sup> alkalische Kupferlösungen beim Kochen unter Ausscheidung von Kupferoxydul zu reduzieren. Als Reagens hierbei dient vorwiegend FEHLINGSche Lösung (alkalische Seignettesalz-Kupfersulfatlösung).

Allerdings handelt es sich bei dieser Reaktion nicht um eine einfache stöchiometrisch verlaufende Oxydation der Aldosen zu den betreffenden Säuren, sondern um einen sehr verwickelten Vorgang unter Aufspaltung des Zuckermoleküles. Nur so ist zu erklären, daß die Fructose trotz ihrer Ketonnatur dabei leichter und stärker reduziert (vgl. S. 852) als Glucose. Nach F. FISCHLER K. TÄUFEL und S. W. SOUCI<sup>3</sup> findet durch das Alkali zunächst eine Aufspaltung des Hexosemoleküls in Ketten aus je 3 C-Atomen statt, im besonderen in Dioxyaceton und Methylglyoxal, deren Reduktionswirkung (Reduktionspotential) die der Zuckerarten weit übertrifft. Dioxyaceton und Methylglyoxal reduzieren FEHLINGSche Lösung bereits in der Kälte, wobei allerdings Methylglyoxal in Gegenwart von Kupfersulfat in alkalischer Lösung so empfindlich ist, daß es fast augenblicklich zerstört wird.

Eine Folge dieses verwickelten Verlaufes der Reduktion FEHLINGScher Lösung ist zunächst, daß die darauf beruhende Zuckerbestimmung nur unter

<sup>1</sup> J. TILLMANS, H. HOLL u. L. JARIWALA: Z. 1928, 56, 26.

<sup>2</sup> Vgl. S. 885.

<sup>3</sup> F. FISCHLER, K. TÄUFEL u. S. W. SOUCI: Zeitschr. angew. Chem. 1928, 41, 950.

genau gleichen Versuchsbedingungen reproduzierbar ist, eine weitere, daß Zuckergehalt und abgeschiedene Kupferoxydulmenge keine geradlinige Funktion miteinander bilden. Man ist daher genötigt, aus geeigneten auf gleichen Versuchsbedingungen aufgebauten Tabellen die einer bestimmten Kupfer- bzw. Kupferoxydulmenge entsprechende Zuckermenge zu entnehmen.

Die Ausführung der Zuckerbestimmung, also die Feststellung der Reduktionswirkung gegen FEHLINGSche Lösung kann gewichtsanalytisch, maßanalytisch oder auf sonstige Weise erfolgen.

### 1. Gewichtsanalytische Zuckerbestimmung mit Fehlingscher Lösung.

Die gewichtsanalytische Bestimmung ist zuerst von E. MEISSL, später von F. ALLIHN<sup>1</sup> für Glucose ausgearbeitet und ferner auch auf die Bestimmung des Invertzuckers, der Maltose, der Lactose und der Fructose angewendet worden. Für die Berechnung der betreffenden Zuckerarten haben MEISSL, WEIN, SOXHLET und LEHMANN Tabellen angefertigt. Es sind für jede Zuckerart Lösungen von bestimmten Verdünnungen und von bestimmter Menge notwendig. Verschieden ist die Art der Verdünnung und die Dauer des Kochens. Man erhitzt die FEHLINGSche Lösung bzw. deren Verdünnung in einer Porzellanschale, besser in einem ERLIENMEYER-Kolben<sup>2</sup>, entweder zum Kochen, trägt mit einer Pipette die vorgeschriebene Menge der Zuckerlösung ein, oder man vereinigt die Menge FEHLINGSche und Zuckerlösung kalt, erhitzt zum Sieden und kocht dann solange, wie es für die betreffende Zuckerart vorgeschrieben ist, worauf sofort filtriert wird. Zum Filtrieren bedient man sich gewöhnlich besonderer mit einem Pfropfen von Glaswolle und darauf mit feinfaserigem Asbest beschickter Filterröhren aus Kaliglas. Das benutzte Röhrchen wird nach jedesmaligem Gebrauch dadurch wieder gebrauchsfähig gemacht, daß man es mit Salpetersäure, dann mit heißem Wasser, Alkohol und Äther auswäscht und wieder trocknet. Beim Filtrieren setzt man mittels eines Korkes ein Trichterchen auf das Rohr, gibt vorerst etwas heißes Wasser auf das Filter und dann die Flüssigkeit mit dem Kupferoxydul. Die letzten Reste des Niederschlages werden mit einem Gummiwischer und heißem Wasser nachgespült, mehrere Male mit heißem Wasser nachgewaschen, darauf mit Alkohol und zuletzt mit Äther die größte Menge des Wassers entfernt. Nach vollständigem Trocknen leitet man Wasserstoffgas (oder Leuchtgas) durch das Röhrchen und erhitzt bis alles Kupferoxydul zu metallischem Kupfer<sup>3</sup> reduziert ist, das dann zur Wägung gebracht wird.

Die Reduzierung des Kupferoxyduls zu Kupfer im Wasserstoffstrom wird jedoch jetzt meistens, weil zu lästig, nicht mehr vorgenommen, sondern das Kupferoxydul nach FARNSTEINER<sup>4</sup> in bequemerer Weise durch einen trockenen, d. h. mittels konz. Schwefelsäure gewaschenen Luftstrom unter Erhitzen des Filterröhrchens in Kupferoxyd übergeführt und dieses gewogen. 1 Teil CuO = 0,7989 Teile Cu.

Noch einfacher ausführbar ist die Arbeitsweise nach v. FELLEBERG<sup>5</sup>, der das abgeschiedene Kupferoxydul nach Auswaschen mit Alkohol und Äther

<sup>1</sup> E. MEISSL: Neue Zeitschr. Rübenzuckerind. 3, 230; Zeitschr. analyt. Chem. 1879, 18, 348; 1881, 20, 434, ferner ausführlich im Journ. prakt. Chem. 1880 (N. F.), 22, 46.

<sup>2</sup> Von G. BRUHNS (Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 73; vgl. W. FRESSENIUS u. L. GRÜNHUT: Ebendort 1920, 59, 420) empfohlen.

<sup>3</sup> M. D. HADJEFF (Z. 1928, 55, 613) bringt die Menge des hierbei freiwerdenden Wassers zur Wägung und berechnet daraus die Kupfermenge.

<sup>4</sup> FARNSTEINER: Zeitschr. analyt. Chem. 1896, 35, 91.

<sup>5</sup> v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1913, 4, 248. — Vgl. auch Schweizer. Lebensmittelbuch, 3. Aufl., S. 135, und die darin angegebenen Umrechnungstabellen für Zucker aus dem Kupferoxydul.

und anschließend einfachen Trocknen im Filtrerröhrchen zur Wägung bringt<sup>1</sup>. Ein Teil  $\text{Cu}_2\text{O}$  entspricht hierbei 0,8882 Teilen Cu. J. PRITZKER<sup>2</sup> hat ein besonderes Gestell angegeben, in dem sich mehrere Röhrchen gleichzeitig in senkrechter Stellung trocknen lassen. Man kann auch das Kupferoxydul auf einem Glas- oder Porzellanfiltrertiegel<sup>3</sup> sammeln und nach gleicher Behandlung wägen.

Nach A. BERNARDI<sup>4</sup> soll indes die Gegenwart von Pepton (und Fischleim) nach L. ROSENTHALER<sup>5</sup> auch die von anderen Stickstoffverbindungen wie Ammoniumchlorid, Asparagin, Glykokoll, Harnstoff, Harnsäure und Hippursäure die Kupferoxydulwerte fehlerhaft erhöhen. Falls man derartige Abweichungen vermutet, empfiehlt es sich, das Kupferoxydul auf einen Porzellan-Tiegel zu sammeln und nach Wägung durch längeres Glühen bei schwacher Rotglut bis zur Gewichtskonstanz in Kupferoxyd überzuführen. Dessen Gewichtsmenge<sup>6</sup>, mal 0,8995, muß dann der gewogenen Kupferoxydulmenge entsprechen.

Nach L. EYNON und J. H. LANE<sup>7</sup> sollen Erdalkalien, besonders Calciumsalze, auch bereits in kleineren Konzentrationen bei der Kochung mit FEHLINGScher Lösung erniedrigend auf den scheinbaren Zuckergehalt wirken. Diese sind daher zuvor durch Ausfällen mit Kaliumoxalat zu entfernen.

An Lösungen und Arbeitsbedingungen für die einzelnen Zuckerarten gelten folgende, wobei für die Bestimmung der Glucose nach MEISSL und ALLIHN die andere Zusammensetzung der Seignettesalzlösung zu beachten ist.

#### a) Glucose nach MEISSL und ALLIHN.

30 ccm Kupfersulfatlösung (69,26 g reinste Kupfersulfatkrystalle in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt).

30 ccm Seignettesalzlösung (173 g Seignettesalz + 125 g Kaliumhydroxyd zu 500 ccm gelöst) und

60 ccm Wasser werden zum Kochen erhitzt, sodann

25 ccm der nicht mehr als 1%igen Zuckerlösung zugesetzt und noch weitere 2 Minuten im Kochen erhalten.

(S. Tabelle III im Anhang.)

#### b) Invertzucker nach E. MEISSL.

25 ccm Kupfersulfatlösung (wie bei a).

25 ccm Seignettesalz-Natronlauge (nach SOXHLET: 173 g Seignettesalz und 51,6 g Natriumhydroxyd in Wasser gelöst und auf 500 ccm aufgefüllt) und soviel Kubikzentimeter Invertzuckerlösung, als im Höchstbetrage 0,245 g Invertzucker entsprechen, werden gemischt und das Ganze auf 100 ccm gebracht. Die zum Sieden erhitzte Flüssigkeit wird weitere 2 Minuten im Sieden erhalten. (S. Tabelle IV im Anhang.)

#### c) Maltose nach E. WEIN<sup>8</sup>.

25 ccm Kupfersulfatlösung (wie bei a).

25 ccm Seignettesalz-Natronlauge (nach SOXHLET, wie bei b) und

<sup>1</sup> Tabellen zur Ablesung des Zuckergehaltes aus dem gewogenen Kupferoxydul befinden sich bei J. GROSSFELD; Anleitung zu Untersuchung der Lebensmittel S. 361, sowie an der Originalstelle (vgl. Anm. 5, S. 861) und in Schweizer Lebensmittelbuch, 3. Aufl., S. 391.

<sup>2</sup> J. PRITZKER: Z. 1915, 29, 437—439.

<sup>3</sup> Geeignet für diese Zwecke sind auch die Porzellanfiltrertiegel A 2 der Staatl. Porzellanmanufaktur in Berlin. — Goochtiegel wurden hierfür zuerst von HEFELMANN vorgeschlagen.

<sup>4</sup> A. BERNARDI: Biochem. Zeitschr. 1912, 41, 160; 43, 275; Z. 1913, 25, 305, 26, 146.

<sup>5</sup> L. ROSENTHALER: Pharm. Zentralh. 1925, 66, 517—520; Z. 1925, 50, 433.

<sup>6</sup> Zu beachten ist, daß das Kupferoxydul in dickerer Schicht, besonders im Inneren dieser Schicht erst nach längerem Glühen vollständig zu Kupferoxyd umgesetzt wird, weshalb eine wiederholte Wägung erforderlich ist.

<sup>7</sup> L. EYNON u. J. H. LANE: Journ. Soc. chem. Ind. 1923, 42, 143—146; Z. 1924, 47, 454.

<sup>8</sup> F. AUERBACH u. E. BODLÄNDER (Zeitschr. angew. Chem. 1923, 26, 602; Z. 1924, 48, 317) erhielten bei Anwendung der Vorschrift von WEIN für eine Maltose durchweg zu niedrige Ergebnisse, für Maltose nämlich nur 92%  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , während das Jodverfahren (vgl. S. 890) 96,4% unter Annahme nur einer Aldehydgruppe lieferte.

25 ccm der nicht mehr als 1%igen Zuckerlösung, kalt gemischt, zum Kochen erhitzt und 4 Minuten im Kochen erhalten.

(S. Tabelle V im Anhang.)

#### d) Lactose nach SOXHLET.

25 ccm Kupfersulfatlösung (wie bei a).

25 ccm Seignettesalzlösung (nach SOXHLET, wie bei b).

100 ccm eines verdünnten Milchserums (25 ccm Milch mit 400 ccm Wasser verdünnt, nach RITTHAUSEN gefällt, auf 500 ccm aufgefüllt und filtriert) werden zum Sieden erhitzt und 6 Minuten im Sieden erhalten.

(S. Tabelle VI im Anhang.)

#### e) Pentosen.

35 ccm Kupfersulfatlösung (wie bei a),

35 ccm Seignettesalz-Natronlauge (wie bei b),

25 ccm einer  $\frac{1}{4}$ —1%igen Pentosenlösung 4 Minuten lang erhitzt und davon 3 Minuten im Kochen.

In Lösungen von 0,25—1,0% Pentosen liefert hierbei nach W. E. STONE<sup>1</sup> 1 mg Arabinose, 1,9—2,0 mg, 1 mg Xylose 1,86—1,96 mg reduziertes Kupfer. Andere Werte — aber auch unter anderen Versuchsbedingungen — (wie bei Glucose unter a), aber statt des Kochens 30 Minuten im siedenden Wasserbade — erhielten WEISER und ZAITSCHEK<sup>2</sup>. Nach deren Versuchen gelten folgende Beziehungen<sup>3</sup>:

| Cu-Menge  | mg: | 50   | 100  | 150  | 200  | 250   | 300   | 350   | 400   |
|-----------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| Arabinose | mg: | 21,6 | 45,3 | 69,0 | 93,8 | 120,3 | 145,8 | 173,7 | 200,8 |
| Xylose    | mg: | 18,8 | 43,7 | 68,4 | 92,8 | 117,8 | 144,3 | 172,2 | 201,2 |

Die Reduktionswerte weichen nur wenig von denen für Glucose ab (vgl. auch S. 868).

Der Reduktionswert von Arabinose und Xylose oder eines Gemisches der beiden kann daher gleich dem Reduktionswert von Glucose gesetzt werden. Sind in einem Gemisch von Hexosen auch Pentosen vorhanden, so kann man durch Destillation eines besonderen Teiles der Zuckerlösung mit Salzsäure (vgl. Bestimmung der Pentosane weiter unten S. 928) das Furfurol und damit (nach S. 930—934) die Pentosen (Arabinose + Xylose) bestimmen und daraus die den letzteren entsprechende Kupfermenge (= Reduktionswert der Glucose) berechnen; wenn diese von der ganzen Menge des reduzierten Kupfers abgezogen wird, erhält man die der Glucose allein entsprechende.

## 2. Maßanalytische Zuckerbestimmung mit FEHLINGScher Lösung.

### a) Direkte Zuckertitration mit FEHLINGScher Lösung.

Das von FEHLING eingeführte, von SOXHLET<sup>4</sup> berichtigte und abgeänderte Verfahren der Titration einer alkalischen Kupferlösung mit der zu prüfenden Zuckerlösung wird wegen ihrer Umständlichkeit, der Schwierigkeit, den genauen Titrationsendpunkt zu erkennen und der geringeren Genauigkeit gegenüber den nachstehend beschriebenen Verfahren heute kaum mehr angewendet. An seine Stelle sind die folgenden getreten, bei denen entweder das bei der Kochung abgeschiedene Kupferoxydul direkt oder der nicht reduzierte Kupferüberschuß titriert und daraus indirekt die reduzierten Mengen Kupferlösung berechnet werden.

### b) Direkte Titration des abgeschiedenen Kupferoxyduls.

#### α) Oxydimetrisches Verfahren.

Die direkte Titration des bei der Kochung einer Zuckerlösung mit FEHLINGScher Lösung abgeschiedenen Kupferoxyduls durch Lösen in saurer Ferrisulfatlösung und Titration mit Permanganatlösung wurde bereits

<sup>1</sup> W. E. STONE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1890, **23**, 3795.

<sup>2</sup> WEISER u. ZAITSCHEK: Landw. Vers.-Stationen 1903, **58**, 219.

<sup>3</sup> Nach Umrechnung der Originalangaben.

<sup>4</sup> SOXHLET: Journ. prakt. Chem. 1880 (N. F.), **21**, 227.



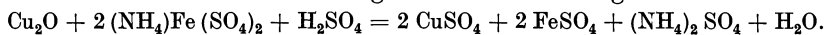
1873 von F. MOHR<sup>1</sup> vorgeschlagen. Später fand auch G. SONNTAG<sup>2</sup> anscheinend ohne Kenntnis der Angaben von MOHR, daß man das im GOOCH-Tiegel gesammelte Kupferoxydul mit einer Lösung von 50 g Ferrisulfat und 50 ccm Schwefelsäure im Liter lösen und dann das gebildete Ferroeisen mit Kaliumpermanganat titrieren kann.

Einige Jahre darauf hat G. BERTRAND<sup>3</sup> Arbeitsvorschriften für Zuckerbestimmungen und Tabellen angegeben, bei denen das Kupferoxydul ebenso titriert wird. Die BERTRANDsche Arbeitsweise selbst ist aber nach G. BRUHNS<sup>4</sup> sehr unzuweckmäßig und steht dem Verfahren vor SCHOORL und REGENBOGEN (S. 867), sowie von BRUHNS an Brauchbarkeit erheblich nach.



Abb. 3.  
Filter-  
röhrchen  
nach  
MAISTER.

Die saure Ferrisulfatlösung stellt man zweckmäßig aus dem gut kristallisierenden und leicht rein zu erhaltenden Eisenalaun,  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , her. Für die Umsetzung des Kupferoxyduls damit nahm man zunächst allgemein die Gleichung an:



Das entstandene Ferrosulfat wird dann mit Kaliumpermanganat, wie folgt, wieder oxydiert:



1 Atom Cu entspricht also 0,2 Mol.  $\text{KMnO}_4$ .

1 ccm 0,1 n  $\text{KMnO}_4 = 6,357 \text{ mg Cu} = 7,157 \text{ mg Cu}_2\text{O} = 7,957 \text{ mg CuO}$ .

Die Eisenlösung erhält man, indem man 100 g Ferriammoniumsulfat in Wasser löst, 50 ccm konz. Schwefelsäure hinzufügt und dann auf 1 l auffüllt.

Die Behandlung ist zunächst die gleiche wie bei der gravimetrischen Bestimmung. Man kocht die zu prüfende Lösung mit FEHLINGscher Lösung, läßt erkalten und filtriert durch ein ALLIHNsches Filterröhrchen oder ein Filterröhrchen mit poröser Glasplatte<sup>5</sup> und wäscht mit Wasser nach. Die Hauptmenge des Kupferoxyduls bleibt dabei im Kochgefäß zurück. Dann spült man die verwendete Saugplatte mit Wasser aus, bringt den Niederschlag im Röhrchen in 50 ccm der sauren Eisenalaunlösung, die man in kleinen Anteilen zugibt, in Lösung<sup>6</sup>, saugt jedesmal gut durch und wäscht schließlich mit Wasser nach. Dann bringt man das Filtrat verlustlos in das Kochgefäß zurück, spült nach und bringt das Kupferoxydul nötigenfalls durch vorsichtiges Erwärmen in Lösung. In die klare blaugrüne Lösung läßt man dann solange 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung zufließen, bis die Färbung in ein beständiges Braungrün übergeht und liest die dazu nötige Menge Kaliumpermanganat ab.

M. ROSENBLATT<sup>7</sup> fand, daß bei dieser Arbeitsweise auch die Gegenwart von Stickstoffverbindungen, wie Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Betain, Glutamin, Harnstoff und Peptonen nicht wesentlich stört. Nach F. ROLLE<sup>8</sup> hat sich das Verfahren bei zahlreichen Untersuchungen bewährt.

<sup>1</sup> F. MOHR: Zeitschr. analyt. Chem. 1873, 12, 296. Die Messung von Kupferoxydul überhaupt ohne Verbindung mit der Zuckerbestimmung, mit Permanganat, wurde bereits von SCHWARZ (Liebig's Annalen 1852, 84, 84) erwähnt.

<sup>2</sup> G. SONNTAG: Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1903, 19, 447; Z. 1904, 7, 285.

<sup>3</sup> G. BERTRAND: Bull. Soc. chim. Paris 1906 (3), 35, 1285; C. 1907, I, 763.

<sup>4</sup> G. BRUHNS: Zentralbl. Zuckerind. 1930, 38, 687 u. 1018; C. 1930, II, 640 u. 2452.

<sup>5</sup> F. JÜSTEN (Arch. Pharm. 1930, 268, 559; C. 1931, I, 1796) empfiehlt hierfür die Glasfilternutsche 11 G 4 oder das ALLIHNsche Rohr 15a G 4 von Schott & Gen. in Jena.

<sup>6</sup> Bei Verwendung von GOOCH-Tiegeln kann man auch deren gesamten Inhalt einschließlich Asbest in das Kochgefäß zurückbringen und mit etwas Eisenlösung nachwaschen. — Ein von H. MAISTER (Chem.-Ztg. 1931, 55, 590; C. 1931 II, 1719) vorgeschlagenes von Schott & Gen. in Jena hergestelltes Filterröhrchen (Abb. 3) enthält einen Glasstab mit Filterplatte als Trägerin der Asbestschicht und gestattet ebenfalls die Asbestschicht mit Niederschlag nach beendeter Filtration in das Reaktionsgefäß zu bringen.

<sup>7</sup> M. ROSENBLATT: Biochem. Zeitschr. 1912, 43, 478; Z. 1913, 26, 145.

<sup>8</sup> F. ROLLE: Zeitschr. Spiritusind. 1916, 39, 227; Z. 1920, 39, 100.

Bei der Nachprüfung dieser Methode stellen in der Folgezeit aber N. SCHOORL und A. REGENBOGEN<sup>1</sup> fest, daß man bei dieser oxydimetrischen Titration des Kupferoxyduls stets etwas zu niedrige Ergebnisse erhält, richtige dagegen, wenn man das Kupferoxydul statt in saurer in neutraler Eisenalaunlösung umsetzt. Da indes diese Umsetzung in neutraler Lösung außerordentlich viel langsamer verläuft als in schwefelsaurer, haben BRAUN und BLEYER<sup>2</sup> dann vorgeschlagen, das Auflösen wie bisher in schwefelsaurer Lösung vorzunehmen, dann aber den erhaltenen Titrationswert um 1,4% desselben als Korrektur zu erhöhen. G. BRUHNS<sup>3</sup> fand an besonderen Versuchen mit Kupferoxydul bestätigt, daß in der Tat das Ergebnis bei Anwendung saurer Eisenammoniumsulfatlösung fast konstant etwa 98,4% des berechneten Wertes betrug, also fast der genannten Korrektur entsprach. Bei der unten (S. 867) beschriebenen Arbeitsweise von SCHOORL und REGENBOGEN<sup>4</sup>, die ebenfalls die Titration des abgedehnten und abgetrennten Kupferoxyduls mit Permanganat empfehlen, kann man also entweder durch Auflösen in neutraler Eisenalaunlösung und Titration der darauf erst angesäuerten Lösung ohne Korrektur oder durch Auflösen in saurer Ferrisulfatlösung und Titration mit Einsetzen von 1,4% Korrektur richtige Werte erhalten. Dabei entspricht der so erhaltene Titrationswert in 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung dem gleichen Betrage an 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung und ermöglicht so die direkte Ablesung des Zuckergehaltes aus den SCHOORLSchen Tabellen (S. 868).

#### β) Jodometrisches Verfahren ohne Filtration.

Besondere Vorteile bietet eine direkte Titration des Kupferoxyduls nach der Abscheidung ohne Filtration von der restlichen Kupferlösung, die in ihren Grundzügen wohl zuerst von F. M. SCALES<sup>5</sup> empfohlen worden ist.

Bei dieser neuerdings viel in Anwendung kommenden Methode löst man das Kupferoxydul in der noch heißen Reaktionsflüssigkeit in Salzsäure, beseitigt den Überschuß derselben mit Natriumbicarbonatlösung, wobei die freiwerdende Kohlensäure die Luft aus Flüssigkeit und Kolben verdrängt, oxydiert mit eingestellter Jodlösung und titriert den Jodüberschuß zurück. Mit Stärke als Indicator erfolgt der Umschlag sehr scharf und in klarer Lösung von Dunkelblau nach Hellblau (Farbe der Kupferlösung). Dabei kann eine genaue Abmessung der FEHLINGSchen Lösung und bei Anwendung reiner Reagenzien auch der Leerversuch fortfallen. Nach G. STEINHOFF<sup>6</sup> bewährte sich die Methode besonders auch zur Untersuchung von Stärkeprodukten. Er fügt zu der nach Kochung von 10 ccm höchstens 1%iger Zuckerlösung mit je 10 ccm FEHLINGScher Lösung I und II sowie 20 ccm Wasser (vgl. SCHOORL, unten S. 867) erhaltenen Mischung zur Lösung des Kupferoxyduls noch heiß 10 ccm 10%ige Salzsäure und beseitigt anschließend den Säureüberschuß mit 10 ccm 8%iger Natriumbicarbonatlösung. Dann fügt er sofort 0,1 N.-Jodlösung im Überschuß (etwa 25 ccm) zu der warmen Flüssigkeit, wobei eine anfangs auftretende weiße Ausscheidung wieder in Lösung geht und die Lösung dunkelgrün wird<sup>7</sup>. Nun läßt er abkühlen und titriert den Jodüberschuß mit 0,1 N.-Natriumthiosulfat

<sup>1</sup> N. SCHOORL u. A. REGENBOGEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 191.

<sup>2</sup> BRAUN u. BLEYER: Zeitschr. analyt. Chem. 1928, 73, 10. Nach BRUHNS, vgl. folgende Anmerkung.

<sup>3</sup> G. BRUHNS: Zentralbl. Zuckerind. 1930, 38, 1018. — Als Ursache der Abweichung nimmt BRUHNS an, daß auf das beim Lösen zuerst entstehende Cuprosulfat der gelöste Sauerstoff aus der Luft an Stelle des Ferrisulfates einwirkt.

<sup>4</sup> SCHOORL u. REGENBOGEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 191.

<sup>5</sup> F. M. SCALES: Ind. Engin. chem. 1919, 11, 747; C. 1920, II, 697.

<sup>6</sup> G. STEINHOFF: Zeitschr. Spiritusind. 1933, 56, 63.

<sup>7</sup> Die Zugabe der Reagenzien einschließlich Jodlösung muß rasch hintereinander erfolgen damit eine Oxydation des Kupferoxydes durch Luftsauerstoff vermieden wird.

unter Zusatz von Stärkelösung als Indicator bis Hellblau. Der Überschuß an Jodlösung soll mindestens 5 ccm betragen. — 1 ccm zur Oxydation des Kupferoxyduls verbrauchte Jodlösung entspricht (vgl. S. 864) 7,157 mg  $\text{Cu}_2\text{O}$  bzw. dem Zuckergehalt nach Tabelle 4, S. 868.

TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>1</sup> lösen den Kupferoxydulniederschlag in salzsaurer Natriumchloridlösung. J. M. KOLTHOFF<sup>2</sup> erhält besonders genaue Ergebnisse bei Gegenwart von Oxalat im Überschuß nach folgender Vorschrift: Man kocht zunächst nach SCHOORL (S. 867). Nach dem Abkühlen setzt man dann 20 ccm molare Natriumcarbonatlösung, 25 ccm 0,1 N.-Kaliumjodatlösung, rasch mit einem Meßzylinder so genau wie möglich 20 ccm 4N.-Salzsäure zu und löst das Kupferoxydul durch Umschwenken. Darauf fügt man 4 ccm N.-Kaliumjodidlösung und nach 1 Minute 20 ccm 10%iger Kaliumoxalatlösung zu und titriert mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung, am Schluß unter Zusatz von Stärke. Ein Leerversuch wird in gleicher Weise ausgeführt, nur mit der Abweichung, daß man 5 statt 4 ccm Kaliumjodidlösung zusetzt und vor Zusatz des Oxalates 2 statt 1 Minute wartet.

#### γ) Azidimetrisches Verfahren.

Nach M. D. HADJEFF<sup>3</sup> kann man das Kupferoxydul auch bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd nach der Gleichung:



in überschüssiger Schwefelsäure lösen und den Säureüberschuß mit 0,5 N.-Natriumbicarbonatlösung gegen Methylorange zurücktitrieren. Eine Art Stufentitration des in Königswasser gelösten Kupferoxyduls vom Methylorangeumschlag an bis zur Rotfärbung von Phenolphthalein hat A. HANAK<sup>4</sup> vorgeschlagen.

#### δ) Sonstige Verfahren.

A. KAACK und A. EICHSTÄDT<sup>5</sup> dagegen lösen bei Milchzuckerbestimmungen das Kupferoxydul in Salpetersäure, kochen mit Bromwasser, bis das überschüssige Brom entfernt ist, machen dann ammoniakalisch, kochen wieder den Ammoniaküberschuß fort, säuern mit Essigsäure an, geben Kaliumjodid zu und titrieren mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung; 1 ccm davon entspricht wie oben 6,357 mg Cu. — Einfacher erscheint der Vorschlag von N. SEMIGANOWSKI<sup>6</sup>, das Kupferoxydul in saurer Natriumchloridlösung zu lösen, mit Kaliumpermanganat zu Kupferchlorid zu oxydieren und dann dieses jodometrisch zu titrieren.

Schließlich hat E. KOMM<sup>7</sup> ein Mikroverfahren zur Bestimmung kleiner Zuckermengen durch colorimetrische Messung der Kupferoxydulmenge angegeben. Das einfach ausführbare Verfahren beruht darauf, daß man die zu prüfende, entweißte Lösung in Anlehnung an die gebräuchlichen Reduktionsverfahren zur Zuckerbestimmung mit FEHLINGScher Lösung behandelt, das abgeschiedene Kupferoxydul durch Schleudern abtrennt, mit Salpetersäure oxydiert, dann den Ammoniak löst und das Kupfer colorimetrisch ermittelt. Die Fehlergrenze überschreitet hierbei nicht 3—4% des absoluten Wertes.

### e) Zuckerbestimmung durch indirekte Titration des Kupferüberschusses.

#### α) Jodometrisches Verfahren von N. SCHOORL.

Die Titration des bei der Kochung mit FEHLINGScher Lösung nicht reduzierten Kupferüberschusses hat vor allem auf Grund der Arbeiten von N. SCHOORL<sup>8</sup> vielfache Anwendung gefunden. Die Arbeitsweise ist eine Verbesserung der jodometrischen Methode von MAQUENNE<sup>9</sup>, der wieder das Verfahren von K. B. LEHMANN<sup>10</sup> dadurch verbessert hatte, daß er für die Titration

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1920, 11, 129; 1932, 23, 77.

<sup>2</sup> J. M. KOLTHOFF: Chem. Weekbl. 1926, 33, 61; Z. 1929, 57, 474.

<sup>3</sup> M. D. HADJEFF: Z. 1928, 55, 615.

<sup>4</sup> A. HANAK: Z. 1921, 42, 248.

<sup>5</sup> A. KAACK u. A. EICHSTÄDT: Milchw. Forsch. 1928, 6, 62; Z. 1930, 60, 341.

<sup>6</sup> N. SEMIGANOWSKY: Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 191; Z. 1932, 64, 402.

<sup>7</sup> E. KOMM: Zeitschr. angew. Chem. 1925, 38, 1094.

<sup>8</sup> N. SCHOORL: Zeitschr. angew. Chem. 1898, 11, 633; Pharm. Weekbl. 1912, 49, 678; Z. 1914, 27, 335; Z. 1920, 39, 180. — N. SCHOORL u. A. REGENBOGEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 191.

<sup>9</sup> MAQUENNE: Bull. Soc. Chim. 1898 [3], 19/20, 921; Z. 1899, 2, 660.

<sup>10</sup> K. B. LEHMANN: Arch. Hygiene 1897, 30, 267.

das Kupferoxydul nicht abfiltrierte, sondern direkt titrierte. Eine von E. RUPP und F. LEHMANN<sup>1</sup> veröffentlichte Vorschrift stimmt mit der von SCHOORL bis auf das Verhältnis der Menge der verwendeten FEHLINGSchen Lösung zur Menge der Zuckerlösung überein<sup>2</sup>.

Der praktische Wert des Verfahrens von SCHOORL in der Ausführung von N. SCHOORL und A. REGENBOGEN besteht aber nicht allein in dieser Einfachheit der Ausführung, verbunden mit hoher Genauigkeit, sondern auch darin, daß für alle Zuckerarten die gleichen Versuchsbedingungen gelten, so daß die einzelnen Zuckerarten, auch die Pentosen und die reduzierenden Disaccharide, dadurch direkt miteinander vergleichbar werden. Nach der Arbeitsweise von SCHOORL wird auch der Invertzucker in Wein nach der amtlichen Anweisung<sup>3</sup> bestimmt.

Die Ausführung der Zuckerbestimmung geschieht nach SCHOORL und REGENBOGEN, wie folgt:

In einem ERLÉNMEYER-Kolben aus Jenaer Glas von 200—300 ccm Inhalt werden 10 ccm der Lösung A (34,6 g krystallisiertes Kupfersulfat in 500 ccm), dann 10 ccm der Lösung B (173 g Seignettesalz und 50 g Natriumhydroxyd<sup>4</sup> in 500 ccm) pipettiert, die Zuckerlösung, die im allgemeinen bis zu etwa 100 mg Zucker enthalten darf, zugegeben und so viel Wasser zugesetzt, daß die Gesamtmenge stets 50 ccm beträgt. Das Gemisch wird über einer passenden BUNSEN-Flamme erhitzt, wobei die Zeit bis zum beginnenden Sieden etwa 3 Minuten betragen soll, und genau 2 Minuten (für alle Zuckerarten) im Sieden gehalten. Der ERLÉNMEYER-Kolben wird auf ein Drahtnetz gestellt, das mit einer Asbestpappe, in der eine für den Kolben passende runde Öffnung freigehalten wird, bedeckt ist. Die Flüssigkeit soll nur mäßig kochen, damit die Raummenge sich durch Verdampfen nicht merklich ändert.

Dann kühlt man schnell in kaltem Wasser bis ungefähr 25° ab und fügt 3 g Kaliumjodid, in höchstens 10 ccm Wasser gelöst, hinzu; darauf werden 10 ccm 25%ige Schwefelsäure (1 Vol. Schwefelsäure + 6 Vol. Wasser) zugegeben und unmittelbar unter fortwährendem Umschwenken mit  $\frac{1}{10}$  N.-Natriumthiosulfatlösung titriert, bis die Jodfärbung auf Gelb zurückgegangen ist, ziemlich viel Stärkelösung hinzugefügt und langsam weitertitriert, bis das Blau aus der Flüssigkeit völlig verschwunden ist und nur das Rahmgelb des Cuprojodids übrig bleibt und sich einige Minuten unverändert hält.

Der Unterschied der durch den Leerversuch ermittelten und der bei der Bestimmung erhaltenen Zahl gibt die vom Zucker reduzierte Kupfermenge in Kubikzentimetern 0,1 N.-Thiosulfatlösung an. Hieraus erhält man aus der folgenden Tabelle 4<sup>5</sup> je nach vorhandener Zuckerart die entsprechende Zuckermenge.

Wie bereits erwähnt, kann man auch bei der Versuchsanstellung nach SCHOORL das abgeschiedene Kupferoxydul nach S. 863 mit Kaliumpermanganat oder direkt in der Lösung mit Jod nach S. 865 titrieren. — Auch wird es oft möglich sein, die Menge des Kupferoxyduls nach S. 861 durch Wägung festzustellen, in Kubikzentimeter 0,1 N.-Thiosulfat umzurechnen und dann die Tabelle von SCHOORL zu benutzen. Hierbei entsprechen je 1 mg Cu<sub>2</sub>O 0,1397 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung.

<sup>1</sup> E. RUPP u. F. LEHMANN: Arch. Pharm. 1909, 247, 516.

<sup>2</sup> Vgl. dazu E. SCHOWALTER: Z. 1919, 38, 221.

<sup>3</sup> Doch sind in der Berechnungstabelle, die dieser Anweisung beiliegt, einige Zahlen etwas (unwesentlich) verschieden von der nachstehenden SCHOORL angegeben.

<sup>4</sup> Kleine Carbonatmengen darin bzw. in der FEHLINGSchen Lösung sind nach W. FRESSENIUS u. L. GRÜNHUT (Zeitschr. analyt. Chem. 1920, 59, 416—417) ohne wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis der Invertzuckerbestimmung.

<sup>5</sup> Vgl. N. SCHOORL: Z. 1920, 39, 180. — Im Original sind außerdem Zwischenwerte (Interpolationsdifferenzen) angegeben.

Tabelle 4.

| Thiosulfat-<br>lösung 0,1 N<br>ccm | Kupfer<br>(Cu)<br>mg | Glucose<br>(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )<br>mg | Fructose<br>(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )<br>mg | Invertzucker<br>als   |   | Galaktose<br>(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )<br>mg | Mannose<br>(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )<br>mg | Lactose<br>(C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub><br>+ H <sub>2</sub> O)<br>mg | Maltose<br>(C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )<br>mg | Arabinose<br>(C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )<br>mg | Xylose<br>(C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )<br>mg | Rhamnose<br>(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )<br>mg |
|------------------------------------|----------------------|---|--|---|---|---|---|--|---|---|--|--|
|                                    |                      |   |  | Invert-<br>zucker<br>(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )<br>mg | Saccha-<br>rose<br>(C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )<br>mg |   |   |  |   |   |  |  |
| 1                                  | 6,4                  | 3,2   | 3,2  | 3,2   | 3,1   | 3,3   | 3,1   | 4,6  | 5,0   | 3,0   | 3,1  | 3,2  |
| 2                                  | 12,7                 | 6,3   | 6,4  | 6,4   | 6,2   | 7,0   | 6,3   | 9,2  | 10,5  | 6,0   | 6,3  | 6,5  |
| 3                                  | 19,1                 | 9,4   | 9,7  | 9,7   | 9,3   | 10,4  | 9,5   | 13,9   | 16,0  | 9,2   | 9,5  | 9,9  |
| 4                                  | 25,4                 | 12,6  | 13,0   | 13,0  | 12,4  | 14,0  | 12,8  | 18,6   | 21,5  | 12,3  | 12,8   | 13,3   |
| 5                                  | 31,8                 | 15,9  | 16,4   | 16,4  | 15,6  | 17,5  | 16,1  | 23,3   | 27,0  | 15,5  | 16,1   | 16,8   |
| 6                                  | 38,2                 | 19,2  | 20,0   | 19,8  | 18,8  | 21,1  | 19,4  | 28,1   | 32,5  | 18,7  | 19,4   | 20,2   |
| 7                                  | 44,5                 | 22,4  | 23,7   | 23,2  | 22,0  | 24,7  | 22,8  | 33,0   | 38,0  | 21,9  | 22,8   | 23,7   |
| 8                                  | 50,9                 | 25,6  | 27,4   | 26,5  | 25,2  | 28,3  | 26,2  | 38,0   | 43,5  | 25,2  | 26,2   | 27,2   |
| 9                                  | 57,3                 | 28,9  | 31,1   | 29,9  | 28,4  | 32,0  | 29,6  | 43,0   | 49,0  | 28,6  | 29,6   | 30,8   |
| 10                                 | 63,6                 | 32,3  | 34,9   | 33,4  | 31,7  | 35,7  | 33,0  | 48,0   | 55,0  | 32,0  | 33,0   | 34,4   |
| 11                                 | 70,0                 | 35,7  | 38,7   | 36,8  | 35,0  | 39,4  | 36,5  | 53,0   | 60,5  | 35,4  | 36,5   | 38,0   |
| 12                                 | 76,3                 | 39,0  | 42,4   | 40,3  | 38,3  | 43,1  | 40,0  | 58,0   | 66,0  | 38,8  | 40,0   | 41,6   |
| 13                                 | 82,7                 | 42,4  | 46,2   | 43,8  | 41,6  | 46,8  | 43,5  | 63,0   | 72,0  | 42,2  | 43,5   | 45,2   |
| 14                                 | 89,1                 | 45,8  | 50,0   | 47,3  | 44,9  | 50,5  | 47,0  | 68,0   | 78,0  | 45,6  | 47,0   | 48,8   |
| 15                                 | 95,4                 | 49,3  | 53,7   | 50,8  | 48,2  | 54,3  | 50,6  | 73,0   | 83,5  | 49,0  | 50,6   | 52,4   |
| 16                                 | 101,8                | 52,8  | 57,5   | 54,3  | 51,6  | 58,1  | 54,2  | 78,0   | 89,0  | 52,4  | 54,2   | 56,0   |
| 17                                 | 108,1                | 56,3  | 61,2   | 58,0  | 55,1  | 61,9  | 57,9  | 83,0   | 95,0  | 55,8  | 57,9   | 59,8   |
| 18                                 | 114,4                | 59,8  | 65,0   | 61,8  | 58,7  | 65,7  | 62,2  | 88,0   | 101,0   | 59,3  | 62,6   | 63,5   |
| 19                                 | 120,8                | 63,3  | 68,7   | 65,5  | 62,3  | 69,6  | 65,3  | 93,0   | 107,0   | 62,9  | 65,3   | 67,3   |
| 20                                 | 127,2                | 66,9  | 72,4   | 69,4  | 65,9  | 73,4  | 69,2  | 98,0   | 112,5   | 66,5  | 69,2   | 71,0   |
| 21                                 | 133,5                | 70,7  | 76,2   | 73,3  | 69,6  | 77,2  | 73,1  | 103,0  | 118,5   | 70,2  | 73,1   | 74,8   |
| 22                                 | 139,8                | 74,5  | 80,1   | 77,2  | 73,3  | 81,2  | 77,0  | 108,0  | 124,5   | 74,0  | 77,0   | 78,6   |
| 23                                 | 146,2                | 78,5  | 84,0   | 81,2  | 77,1  | 85,1  | 81,0  | 113,0  | 130,5   | 77,9  | 81,0   | 82,4   |
| 24                                 | 152,6                | 82,6  | 87,8   | 85,2  | 80,9  | 89,0  | 85,0  | 118,0  | 136,5   | 81,8  | 85,0   | 86,2   |
| 25                                 | 159,0                | 86,6  | 91,7   | 89,2  | 84,7  | 93,0  | 89,0  | 123,0  | 142,5   | 85,7  | 89,0   | 90,0   |

F. AUERBACH und E. BODLÄNDER<sup>1</sup> erhielten an reinem Invertzucker nach der Arbeitsweise von SCHOORL etwas (in der Dezimale) abweichende Zahlen für Invertzucker und geben folgende verbesserte Tabelle an:

Tabelle 5.

| 0,1 N.-<br>Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invertzucker<br>nach |            | 0,1 N.-<br>Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invertzucker<br>nach |            | 0,1 N.-<br>Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invertzucker<br>nach |            |
|--|----------------------|------------|--|----------------------|------------|--|----------------------|------------|
|  | A. u. B.<br>mg       | SCH.<br>mg |  | A. u. B.<br>mg       | SCH.<br>mg |  | A. u. B.<br>mg       | SCH.<br>mg |
| 1  | 3,2                  | 3,2        | 9  | 29,6                 | 29,9       | 17   | 58,2                 | 58,0       |
| 2  | 6,4                  | 6,4        | 10   | 33,0                 | 33,4       | 18   | 61,9                 | 61,8       |
| 3  | 9,7                  | 9,7        | 11   | 36,4                 | 36,8       | 19   | 65,8                 | 65,5       |
| 4  | 13,0                 | 13,0       | 12   | 40,0                 | 40,3       | 20   | 69,7                 | 69,4       |
| 5  | 16,3                 | 16,4       | 13   | 43,6                 | 43,8       | 21   | 73,6                 | 73,3       |
| 6  | 19,6                 | 19,8       | 14   | 47,3                 | 47,3       | 22   | 77,6                 | 77,2       |
| 7  | 22,9                 | 23,2       | 15   | 50,9                 | 50,8       | 23   | 81,7                 | 81,2       |
| 8  | 26,2                 | 26,5       | 16   | 54,5                 | 54,3       |  |                      |            |

W. FRESSENIUS und L. GRÜNHUT<sup>2</sup> erhielten nach SCHOORL bzw. nach MEISSL (S. 861) gleiche Ergebnisse. Nach AUERBACH und BODLÄNDER dagegen zeigte das gewichtsanalytische Verfahren besonders bei größeren Zuckergehalten nicht unerhebliche Abweichungen.

<sup>1</sup> F. AUERBACH u. E. BODLÄNDER: Zeitschr. angew. Chem. 1922, 35, 631.

<sup>2</sup> W. FRESSENIUS u. L. GRÜNHUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1920, 59, 419.

β) Das Rhodan-Jodkaliumverfahren von G. BRUHNS<sup>1</sup>.

Das Verfahren von SCHOORL ist durch verhältnismäßig großen Verbrauch an Kaliumjodid gekennzeichnet, das seiner Verwendung besonders bei Betriebsanalysen und sonstigen Reihenversuchen wegen der hohen Kosten des Salzes hinderlich ist<sup>2</sup>. G. BRUHNS<sup>1</sup> hat daher, in erster Linie für die Bestimmung des Invertzuckers neben Saccharose, mit Erfolg den größten Teil des Kaliumjodids durch Kaliumrhodanid ersetzt und gezeigt, daß man nach seiner Arbeitsvorschrift nicht minder schnell und genau den Invertzuckergehalt findet. Zwar beobachteten F. AUERBACH und E. BODLÄNDER<sup>3</sup>, daß durch den Zusatz des Kaliumrhodanids die Zeitdauer der Titration das Ergebnis beeinflusst bzw. ungenau machen kann; doch stehen diesem Befunde die Angaben von BRUHNS entgegen, nach denen bei genauer Einhaltung seiner Arbeitsvorschrift zuverlässigere und genauere Werte in kürzerer Zeit als nach irgendeinem anderen Verfahren erhalten werden. Die Methode ist nach O. E. KALBERER<sup>4</sup> auch für Obst- und Frankenweine vorzüglich geeignet und liefert praktisch die gleichen Werte wie das gravimetrische Verfahren, unter der Voraussetzung, daß bei Weinen der Eigenverbrauch an Jod durch besonderen Versuch berücksichtigt wird.

Die Vorschrift von BRUHNS sei daher hier ausführlich wiedergegeben:

A. Reagenzien.

1. Kupfersulfatlösung, etwa 70 g krystallisiertes Kupfersulfat werden zu 1000 ccm gelöst und die Lösung nach einigen Tagen durch Filtrieren geklärt. Der Boden der Vorratsflasche muß dauernd völlig klar bleiben.

2. Seignettesalz-Natronlauge. Man schüttet 346 g Seignettesalz „für Analyse“ in einen nicht zu dünnwandigen Meßkolben von 1000 ccm, läßt 100 g Natriumhydroxyd in Stangen vorsichtig darauf fallen und gießt soviel Wasser zu, daß man noch umschwenken kann. Wenn sich nach Umschwenken alles gelöst hat, kühlt man ab, füllt auf und mischt. — Die Alkalität der Lösung gegen Phenolphthalein soll für 10 ccm 23,6—24,0 ccm betragen. Beim Stehen sich bildende Flocken können durch Absitzenlassen entfernt werden. Das verwendete Natriumhydroxyd muß frei von Eisen und besonders von salpetriger Säure sein; 10 g davon in etwa 100 ccm Wasser gelöst und mit Schwefelsäure übersättigt dürfen nach Lösen einiger Krystalle von reinem Kaliumjodid und etwas Stärke darin binnen 10 Minuten keine Blaufärbung zeigen.

3. Verdünnte Schwefelsäure. Man bringt in eine gewöhnliche Vorratsflasche 850 ccm Wasser und gießt unter stetem Umschwenken 150 ccm konz. reine Schwefelsäure hinzu. Die Lösung darf nach Zusatz einer Spur Natriumchlorid oder Salzsäure, mit Diphenylamin-Schwefelsäure unterschichtet, höchstens eine ganz schwach blau gefärbte Zone zeigen, die sich bei vorsichtigem Schwenken nicht wesentlich verstärkt.

4. Rhodan-Jodkaliumlösung. 65 g Kaliumrhodanid<sup>5</sup> und 10 g jodatfreies Kaliumjodid<sup>6</sup> werden zusammen in Wasser gelöst und unter Zusatz von 1 ccm N.-Natronlauge<sup>7</sup> zu 250 ccm aufgefüllt. Die Lösung wird in einer braunen, gut verschlossenen Flasche aufbewahrt und soll auch nach langer Zeit noch Phenolphthalein deutlich röten. Spuren von Ausscheidung in der Lösung läßt man sich absetzen.

5. Natriumthiosulfatlösung. Man löst 34,50 g des reinen Salzes (für Analyse) in einem Liter-Meßkolben, in den man vorher etwa 2 ccm N.-Natronlauge und 100—200 ccm

<sup>1</sup> G. BRUHNS: Chem.-Ztg. 1918, 22, 301; Zentralbl. Zuckerind. 1920, 27, 621, 664 u. 767.

<sup>2</sup> Zur Aufarbeitung von Jodrückständen, die allerdings keine Rhodanide enthalten dürfen, fällt F. TH. VAN VOORST (Chem. Weekbl. 1931, 28, 129, 442) alles Jod mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid als Kupferjodür aus. Dieses zerlegt er kochend mit der berechneten Menge Kalilauge nach der Gleichung:  $2 \text{CuJ} + 2 \text{KOH} = 2 \text{KJ} + \text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ , reinigt das Filtrat mit Tierkohle und etwas Magnesiumpulver von den letzten Kupferspuren und dampft zur Krystallisation des Kaliumjodids ein.

<sup>3</sup> F. AUERBACH u. E. BODLÄNDER: Zeitschr. angew. Chem. 1922, 35, 631—632.

<sup>4</sup> O. E. KALBERER: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 114.

<sup>5</sup> Reines Salz „für Analyse“; die Lösung 1:10 muß auch bei Zusatz von 1 ccm 6 N.-Salzsäure farblos bleiben.

<sup>6</sup> Zur Prüfung löst man 1 g in 10 ccm Wasser, fügt 1 ccm der verd. Schwefelsäure und etwas Stärkelösung hinzu. Innerhalb 5 Minuten darf keine Blaufärbung eintreten.

<sup>7</sup> Der Zusatz der Alkalis dient der Haltbarkeit, indem die Lösung dadurch gegen den Einfluß der Kohlensäure der Luft unempfindlich wird.

Wasser gebracht hat und bestimmt den Wirkungswert dieser Lösung mittels fein zerriebenem Kaliumdichromat „für Analyse“, von dem man 0,6802 g zu 100 ccm löst, und 20 ccm davon zur Titration verwendet, die der gleichen Menge 0,1387 N.-Thiosulfatlösung entsprechen. Aus dem Ergebnis berechnet man die genauen Mengen des Salzes, die für 1000 oder 2000 ccm abzuwägen sind. Das Salz ist in gut verschlossener Flasche unbegrenzt haltbar. Die Stärke der Lösung, 0,1387 n, entspricht dem Kupfergehalt der FEHLING'schen Lösung und ist in der Tabelle VII (Anhang) von BRUHNS zugrunde gelegt.

6. Destilliertes Wasser. Es muß frei von Salpetriger Säure und lufthaltig — nicht ausgekocht — sein.

7. Stärkelösung. In einem Becherglase werden etwa 90 ccm destilliertes Wasser zum Sieden erhitzt und dazu 1 g lösliche Stärke, in einem Probegläse mit Wasser aufgeschwemmt, gegossen. — Wenn die Lösung sich beim Aufbewahren durch Ausflockung trübt, ist neue zu bereiten.

### B. Ausführung.

10,0 ccm Kupferlösung, 10,0 ccm Seignettesalz-Natronlauge und 20,0 ccm Zuckerlösung (oder eine andere passende, genau abgemessene Menge Zuckerlösung und ihre Ergänzung zu 20 ccm durch Wasser) werden in einem 200 ccm-ERLENMEYER-Kolben gut gemischt und auf einem Drahtnetz, welches mit einer Asbestpappe mit Ausschnitt von 60 mm Durchmesser bedeckt ist, durch einen einfachen Brenner möglichst schnell erhitzt und vom Augenblick des Aufkochens an mit verkleinerter Flamme genau 2 Minuten im Sieden erhalten. Während des Anwärmens streut man eine kleine Menge feines Talkpulver auf die Oberfläche der Flüssigkeit. Jedes Umschwenken ist zu unterlassen.

Unmittelbar nach dem Ablauf der Kochdauer entfernt man die Flamme, gießt aus einem kleinen Teilzylinder 50 ccm des lufthaltigen Wassers dazu, stürzt ein kleines Becherglas über die Mündung des Kolbens und kühlt ihn, aufrecht in einer sehr flachen Schale (z. B. Petrischale), stehend, durch einen Wasserstrahl auf 15° oder tiefer ab. Inzwischen wird die Bürette mit Thiosulfatlösung aufgefüllt, alsdann zu der völlig erkalteten Flüssigkeit 2,5 ccm Rhodan-Jodkaliumlösung zugesetzt, umgeschwenkt und 10 ccm verd. Schwefelsäure unter weiterem Schwenken hinzugefügt. Nunmehr läßt man unverzüglich Thiosulfatlösung zulaufen, bis die anfänglich auftretende Bräunung zeitweilig in Grau übergeht. Sodann werden etwa 3 ccm Stärkelösung zugesetzt und die Messung mit Thiosulfatlösung zu Ende geführt, bis der Niederschlag ledergelb bis rot — je nach der Menge des ausgeschiedenen Kupferoxyduls — aussieht und die Flüssigkeit in 5 Minuten nicht mehr blau oder grau wird.

Der Wert von 10,0 ccm Kupferlösung wird ebenfalls nach dem Kochen mit Seignettesalz-Natronlauge und 20 ccm Wasser, genau wie bei der Zuckerbestimmung, festgestellt, und von dem so ermittelten „Kupfertiter“ zieht man die nach der Reduktion verbrauchte Menge Thiosulfatlösung ab. Die erhaltene Zahl entspricht dem ausgefällten Kupfer und liefert bei dem Aufsuchen in der Tabelle die entsprechende Menge Invertzucker.

Enthält die Zuckerlösung jodbindende Stoffe, so stellt man ihren „Jodtiter“ fest, indem man 10,0 ccm Kupferlösung, 10,0 ccm Seignettesalz-Natronlauge und die bei dem Reduktionsversuch verwendete Menge Zuckerlösung (mit Wasser zu 20 ccm ergänzt) ohne Kochen mit 50 ccm lufthaltigem Wasser verdünnt, auf 15° oder tiefer abkühlt und in der angegebenen Weise mit Thiosulfatlösung mißt. Der so ermittelte, etwas niedrigere Jodtiter tritt dann an die Stelle des Kupfertiters. In solchen Fällen darf bei genauen Untersuchungen nur Seignettesalz verwendet werden, das ohne und mit Kochen gleiche oder höchstens um 0,05 ccm abweichende Kupfertiter zeigt.

BRUHNS hat das vorstehende Verfahren besonders auch zur Bestimmung kleiner Mengen Invertzucker neben viel Saccharose empfohlen. So ist die Tabelle VII (im Anhang) außer auf reinen Invertzucker auch auf

Saccharoseeinwaagen von 0,5–8 g bezogen. Eine geringe Eigenreduktion reiner Raffinade ist dabei bereits berücksichtigt.

Auch N. SCHOORL und I. M. KOLTHOFF<sup>1</sup> empfehlen zur Ersparung von Kaliumjodid nach BRUHNS Rhodanidzusatz. Nach ihren Angaben wird die Zuckerlösung zunächst nach SCHOORL (S. 867) gekocht. Nach dem Abkühlen werden 10 ccm 2%ige Kaliumjodidlösung zugesetzt. Man säuert darauf mit 10 ccm 25%iger Salzsäure an und fügt gleich darauf 10 ccm 20%ige Kaliumrhodanidlösung hinzu. Dann wird mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung titriert und der Zuckergehalt aus der Tabelle von SCHOORL (S. 868) abgelesen.

### 3. Maßanalytische Zuckerbestimmung mit LUFFScher Lösung.

Bei der Kochung mit FEHLINGScher Lösung wirkt die starke Alkaliionenkonzentration außerordentlich heftig und stark zersetzend auf den vorhandenen Zucker ein, so daß nur unter genau gleichmäßigen Arbeitsbedingungen reproduzierbare Werte erhalten werden können; da diese Bedingungen bei praktischen Versuchen naturgemäß nur unvollkommen einzuhalten sind, bleibt die Genauigkeit der Zuckerbestimmung mit FEHLINGScher Lösung begrenzt.

Einen erheblichen Fortschritt bedeutet daher die Zuckerbestimmung mit einer carbonatalkalischen Kupferlösung, die zuerst von LUFF (1898)<sup>2</sup> verwendet wurde, um ein konstantes Reduktionsverhältnis für Glucose und Maltose zu finden, was ihm allerdings nicht gelang. STANLEY-BENEDICT haben dann (1900) die Lösung zur Prüfung von Urin auf Zucker empfohlen. N. SCHOORL<sup>3</sup> fand

weiter im Jahre 1912, daß die LUFFSche Lösung zwar von Aldosen und Ketosen, nicht aber von gewöhnlichen Aldehyden reduziert wird, also gegenüber der FEHLINGSchen Lösung viel spezifischer reagiert; aber erst in letzter Zeit hat SCHOORL<sup>4</sup> die LUFFSche Lösung zur genauesten Bestimmung von Zuckerarten empfohlen.

Bei diesen Untersuchungen beobachtete er die merkwürdige und praktisch wichtige Tatsache, daß Glucose, die beim Kochen anfangs sehr schnell reduziert, und Fructose, deren Reduktionswert bald sehr gleichmäßig ansteigt, nach 10 Minuten genau die gleiche Menge Kupfer abscheiden (vgl. Abb. 4). Bei 10 Minuten Kochzeit gilt also für Glucose die gleiche Reduktionstabelle wie für Fructose, also auch für Invertzucker. Aus diesem Grunde ist dem nachstehenden Verfahren eine Kochzeit von 10 Minuten zugrunde gelegt. Ein kleiner Fehler in der Kochzeit ist nicht von großem Einfluß auf das Ergebnis; doch muß die Kochung um bei der langen Kochzeit Konzentrationsänderungen auszuschließen, am Rückflußkühler ausgeführt werden.

Die LUFFSche Lösung wird durch Lösen von Kupfersulfat, Citronensäure und Natriumcarbonat bereitet und hat den besonderen praktischen Vorzug, bei der Aufbewahrung unbegrenzt haltbar zu sein.

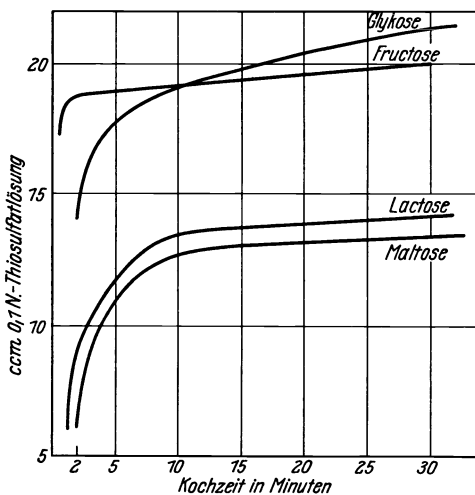


Abb. 4.  
Zeit-Reduktionskurven für 50 mg der Zuckerarten.

<sup>1</sup> N. SCHOORL u. I. M. KOLTHOFF: Pharm. Weekbl. 1918, 55, 344; C. 1918, II, 477; vgl. Chem. Weekbl. 1925, 22, 285; C. 1925, II, 1491.

<sup>2</sup> Nach SCHOORL, vgl. Anm. 4.

<sup>3</sup> N. SCHOORL: Chem. Weekbl. 1922, 9, 678.

<sup>4</sup> N. SCHOORL: Z. 1929, 57, 566.



Die Arbeitsweise nach SCHOORL ist folgende:

### A. Reagenzien.

1. Kupferlösung nach LUFF-SCHOORL. 25 g völlig eisenfreies Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) werden in 100 ccm Wasser gelöst; weiter werden 50 g Citronensäure ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) und 388 g kristallisiertes Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) in 300—400 ccm lauwarmen Wasser gelöst. Man setzt dann die Citronensäurelösung zu der Natriumcarbonatlösung, fügt die Kupfersulfatlösung hinzu, und füllt auf 1 l auf.

2. N.-Kaliumjodidlösung. 16,6 g des Salzes in 100 ccm.

3. Salzsäure. 25%ig, eisenfrei.

4. Kaliumrhodanidlösung. 20 g des Salzes in 100 ccm.

5. Essigsäure. Etwa 0,4 N = 24 ccm Eisessig im 1.

6. Salzsäure. Etwa 0,75 N:91 ccm 25%ige Salzsäure im 1.

7. Jodlösung (in Kaliumjodid). 0,1 N.

8. Natriumthiosulfatlösung. 0,1 N, die mit 0,01% Quecksilbercyanid konserviert sein kann.

9. Stärkelösung (2 g lösliche Stärke in 100 ccm).

### B. Ausführung.

25 ccm LUFFSche Lösung werden in einen ERLÉNMEYER-Kolben von 300 ccm pipettiert, dazu die Zuckerlösung gefügt und mit Wasser auf 50 ccm gebracht.

Tabelle 6.

| 0,1 N.-Thio-sulfat-lösung<br>ccm | Glucose, Fructose oder Invertzucker ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) |       | Lactose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) |       | Maltose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) |       |
|----------------------------------|---|-------|---|-------|---|-------|
|                                  | mg  | Diff. | mg  | Diff. | mg  | Diff. |
| 1                                | 2,4   |       | 3,6   |       | 3,9   |       |
| 2                                | 4,8   | 2,4   | 7,3   | 3,7   | 7,8   | 3,9   |
| 3                                | 7,2   | 2,4   | 11,0  | 3,7   | 11,7  | 3,9   |
| 4                                | 9,7   | 2,5   | 14,7  | 3,7   | 15,6  | 3,9   |
| 5                                | 12,2  | 2,5   | 18,4  | 3,7   | 19,6  | 4,0   |
| 6                                | 14,7  | 2,5   | 22,1  | 3,7   | 23,5  | 3,9   |
| 7                                | 17,2  | 2,5   | 25,8  | 3,7   | 27,5  | 4,0   |
| 8                                | 19,8  | 2,6   | 29,5  | 3,7   | 31,5  | 4,0   |
| 9                                | 22,4  | 2,6   | 33,2  | 3,7   | 35,5  | 4,0   |
| 10                               | 25,0  | 2,6   | 37,0  | 3,8   | 39,5  | 4,0   |
| 11                               | 27,6  | 2,6   | 40,8  | 3,8   | 43,5  | 4,0   |
| 12                               | 30,3  | 2,7   | 44,6  | 3,8   | 47,5  | 4,0   |
| 13                               | 33,0  | 2,7   | 48,4  | 3,8   | 51,6  | 4,1   |
| 14                               | 35,7  | 2,7   | 52,2  | 3,8   | 55,7  | 4,1   |
| 15                               | 38,5  | 2,8   | 56,0  | 3,8   | 59,8  | 4,1   |
| 16                               | 41,3  | 2,8   | 59,9  | 3,9   | 63,9  | 4,1   |
| 17                               | 44,2  | 2,9   | 63,8  | 3,9   | 68,0  | 4,1   |
| 18                               | 47,1  | 2,9   | 67,7  | 3,9   | 72,2  | 4,2   |
| 19                               | 50,0  | 2,9   | 71,7  | 4,0   | 75,5  | 4,3   |
| 20                               | 53,0  | 3,0   | 75,7  | 4,0   | 80,9  | 4,4   |
| 21                               | 56,0  | 3,0   | 79,8  | 4,1   | 85,4  | 4,5   |
| 22                               | 59,1  | 3,1   | 83,9  | 4,1   | 90,0  | 4,6   |
| 23                               | 62,2  | 3,1   | 88,0  | 4,1   | 94,6  | 4,6   |

Zu dem Gemisch gibt man einige Körnchen Bimsstein und bringt durch leichtes Umschwenken des Kolbens auf freier Flamme von mäßiger Höhe das Gemisch in etwa 2 Minuten zum Kochen, stellt dann auf ein bereitstehendes Drahtnetz mit Asbestbedeckung, unter dem eine passende Flamme vorher angesteckt ist und schließt mit Kautschukstopfen an einen bereitgestellten Kühler an. Von diesem Augenblick an hält man genau 10 Minuten im Kochen. Gleich darauf wird im kalten Wasser abgekühlt und nach 5 Minuten eine der folgenden Titrationen ausgeführt:

a) Cupribestimmung durch Rücktitration. Man setzt 3 g Kaliumjodid und darauf vorsichtig (wegen des starken Schäumens) 25 ccm 25%ige Schwefelsäure hinzu und titriert mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung bis zum reinen Rahmgelb.

In Anlehnung an das Verfahren von BRUHNS (S. 869) kann man nach einiger Übung auch, wie folgt, verfahren<sup>1</sup>: Man setzt 3 ccm N.-Kaliumjodidlösung zu, dann vorsichtig, aber doch so schnell wie möglich, 20 ccm 25%ige Salzsäure und dann 10 ccm

20%ige Kaliumrhodanidlösung, alle drei aus Meßgläschen. Nach kräftigem Umschwenken, bis das Aufbrausen aufhört<sup>2</sup>, wird mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung, gegen Ende unter Zusatz

<sup>1</sup> M. v. D. KREKE (Arch. Suikerind. Nederl.-Indie 1929, 781) rät von dieser Ausführungsform wegen des weniger deutlichen Umschlages ab.

<sup>2</sup> Zusatz eines Tropfens Äther wirkt günstig.

von 1 ccm Stärkelösung, titriert. Der Umschlag geht von Blau auf Rahmfarbig mit violetterm Ton<sup>1</sup>.

Aus dem Unterschied der Titrationsergebnisse mit dem Leerversuch wird nach der Tabelle 6, S. 872 der Zuckergehalt abgelesen.

b) Jodometrische Titration des Kupferoxyduls<sup>2</sup>. Nach Abkühlung der Kochflüssigkeit werden aus einem Meßglase 50 ccm 0,4 N.-Essigsäure zugefügt, umgeschüttelt, mit der Pipette 25 ccm 0,1 N.-Jodlösung zugegeben, wieder umgeschüttelt, dann 55 ccm 0,75 N.-Salzsäure aus einem Meßglas vorsichtig entlang der Kolbenwand auf die Oberfläche der Flüssigkeit zufließen gelassen und darauf umgeschüttelt, bis alles Kupferoxydul gelöst ist, was  $\frac{1}{2}$ —3 Minuten dauern kann. Darauf wird der Jodüberschuß mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung zuerst bis Hellgrün, nach Zufügung von 1 ccm Stärkelösung tropfenweise bis Hellblau titriert (Vergleich mit einer austitrierten Probe). Der so erhaltene Jodüberschuß wird vom Ergebnis eines Leerversuches abgezogen und liefert dann die entsprechende Menge Zucker nach der Tabelle 6.

Der Einfluß von Salzen auf das Ergebnis ergab sich bei Anwendung von 50 mg Glucose bei Zusatz von 1 Millimol der Salze, wie folgt (statt 19,0 ccm):

|                     | Natriumchlorid | Ammoniumchlorid | Calciumchlorid | Magnesiumsulfat | Zinksulfat |
|---------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------|
| Reduktionswert ccm: | 18,90          | 19,25           | 18,80          | 19,30           | 19,90      |
| Abweichung ccm:     | —0,10          | +0,25           | —0,20          | +0,30           | +0,90      |

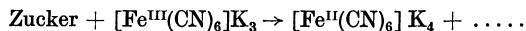
Nur bei Zinksulfat kommt der Einfluß praktisch in Betracht, doch ist bei dem vorstehenden Versuch die Zinkmenge noch viermal so groß, wie sie bei der Klärung nach CARREZ (S. 881) höchstens sein kann.

#### 4. Sonstige Zuckerbestimmungsverfahren durch Reduktion.

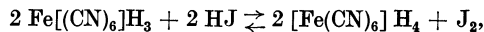
##### a) Kaliumferricyanidverfahren nach H. C. HAGEDORN und B. N. JENSEN<sup>3</sup>.

Die zunächst für Blutzucker als Mikroverfahren (für 0,002—0,385 mg Zucker) ausgearbeitete Arbeitsvorschrift wurde von B. VON ISSEKUTZ und J. VON BOTH<sup>4</sup> zu einem Halbmikroverfahren umgestaltet, das nach H. GOHR<sup>5</sup> auch für nahrungsmittelchemische Untersuchungen, z. B. zur Lactosebestimmung in der Milch geeignet ist.

Das Verfahren beruht darauf, daß nach Abscheidung störender Begleitstoffe — am besten nach CARREZ (S. 881) — der Zucker Kaliumferricyanid in Gegenwart von Natriumcarbonat zu Kaliumferrocyanid reduziert:



Das überschüssige Kaliumferricyanid wird nun jodometrisch bestimmt. Dieser Bestimmung (nach LENSSEN und MOHR) liegt folgende umkehrbare Gleichung zugrunde



deren Verlauf man durch Zusatz von Zinksulfat quantitativ von links nach rechts erzwingt, indem das Zinksalz der Ferrocyanwasserstoffsäure sich unlöslich abscheidet.

Die Titration des Jods erfolgt in essigsaurer Lösung mit Natriumthiosulfat unter Stärkezusatz. — Bezüglich der Einzelheiten wird auf die genannte Arbeit

<sup>1</sup> Man kann dabei mit einer austitrierten Probe vergleichen oder noch besser auf die örtliche Wirkung des letzten einfallenden Tropfens Thiosulfatlösung am Rande der Flüssigkeit achten.

<sup>2</sup> Nach SCALES: Journ. Ind. Engin. Chem. 1919, 11, 747. — Vgl. S. 865.

<sup>3</sup> H. C. HAGEDORN u. B. N. JENSEN: Biochem. Zeitschr. 1923, 135, 46; 137, 92; C. 1923, IV, 354 und 490.

<sup>4</sup> B. VON ISSEKUTZ u. J. VON BOTH: Biochem. Zeitschr. 1927, 183, 298; C. 1927, II, 1380.

<sup>5</sup> H. GOHR: Z. 1930, 59, 90.

von GOHR verwiesen, die eine genaue Versuchsanordnung und Tabelle für Lactose enthält.

Neuerdings haben HAGEDORN und JENSEN mit F. LARSEN<sup>1</sup> eine Vereinfachung des Verfahrens unter Verwendung von Reagenstabletten angegeben, nach der sich der Blutzucker in 5 Minuten bestimmen läßt.

Nach den Angaben von HAGEDORN und JENSEN reduzieren auch Harnsäure und Kreatinin das Kaliumferricyanid sehr stark, so daß die Anwendbarkeit des Verfahrens auf Nahrungsmitteluntersuchungen allgemein wohl noch einer eingehenden Durchprüfung bedarf. Vgl. auch H. KRAMER und A. STEINER<sup>2</sup>.

### b) Colorimetrisches Pikratverfahren.

Das von ST. R. BENEDICT und E. OSTERBERG<sup>3</sup> ebenfalls für Mikro Zuckerbestimmungen empfohlene Verfahren beruht darauf, daß man die zu prüfende Zuckerlösung mit Pikrinsäure und Natriumcarbonat im Wasserbade erhitzt, wobei der Zucker die Pikrinsäure zu rot gefärbter Pikraminsäure reduziert. Die entstehende Färbung kann man mit Pikraminsäurelösung oder Kaliumbichromatlösung bekannten Gehaltes oder am besten mit einer nach gleicher Versuchsanordnung aus Zucker gleicher Art und gleicher Menge erhaltenen Vergleichslösung vergleichen.

Die Disaccharide Lactose und Maltose reagieren direkt beim Kochen mit der Pikratlösung, Saccharose und Raffinose erst nach der Inversion.

W. M. DEHN und F. A. HARTMANN<sup>4</sup> haben folgende Arbeitsweise angegeben: 2 g Pikrinsäure und 4 g wasserfreies Natriumcarbonat werden zu 1 Liter gelöst. Andererseits werden 0,95 g reine Saccharose in einem 500 ccm-Kolben in 100 ccm Wasser gelöst, 5 ccm konz. Salzsäure hinzugefügt und auf dem Wasserbade 15 Minuten hindurch erhitzt. Man kühlt ab, fügt einen Überschuß von Natriumcarbonat und 100 ccm der Pikratlösung hinzu, kocht 5 Minuten und füllt zu 1 Liter auf. Die Farbe entspricht 1 g wasserfreiem Monosaccharid. Zum colorimetrischen Vergleich werden von dieser Lösung 100 ccm auf 1000 ccm verdünnt. Von der zu untersuchenden Probe wird nun etwa 1 g, nötigenfalls nach der Inversion, auf 1 Liter gelöst. Von der Lösung werden 10 ccm in einem 100 ccm-Kolben mit 10 ccm der Pikratlösung 10—15 Minuten auf einem Sandbade erhitzt, dann wird auf 100 ccm aufgefüllt und mit der obigen Vergleichslösung verglichen. — Die Genauigkeit beträgt etwa  $\pm 0,1\%$ . Auch für die Milchzuckerbestimmung in Milch ist die Methode geeignet.

BENEDICT und OSTERBERG<sup>3</sup> verwenden zur Entfernung störender Begleitstoffe des Zuckers, z. B. aus Harn, Mercurinitrat und arbeiten nach etwas abgeänderter Vorschrift, die W. THOMAS und R. A. DUTCHER<sup>5</sup> auf Zuckerbestimmungen in Pflanzen in folgender Form anwenden:

Den Pflanzen wird der Zucker durch 95%igen siedenden Alkohol entzogen. Eine bestimmte Menge des Auszuges, 0,025—0,150 g Zucker entsprechend, wird durch Verdampfen vom Alkohol befreit und der Rückstand in 100 ccm Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird mit 10 ccm einer Lösung, die im Liter 110 g Quecksilberoxyd, 80 ccm konz. Salpetersäure und 30 ccm 5%ige Natronlauge enthält, versetzt und in kleinen Anteilen festes Natriumcarbonat hinzugefügt, bis kein Aufschäumen mehr eintritt und die Reaktion schwach alkalisch gegen Lackmus geworden ist. Die Lösung wird dann schnell in 250 ccm-Kolben filtriert, mit etwas 5%iger Natriumbicarbonatlösung nachgewaschen und zur Marke aufgefüllt. 30—50 ccm dieser Lösung, die am besten 0,01—0,07% Zucker enthält, werden in einen 75 ccm-Kolben gebracht, mit 0,3—0,5 g Zinkstaub und zur Bindung der kleinen Menge Quecksilber mit einem Tropfen konz. Salzsäure versetzt, wobei aber die Reaktion der Mischung nicht sauer werden darf. Darauf wird der Kolben nach gehörigem Schütteln 15 Minuten stehen gelassen und die Lösung durch ein hartes Filter filtriert. 5—10 ccm des Filtrates werden nach Feststellung der Abwesenheit von Quecksilber durch Ammoniumsulfid, in einen 50 ccm-Kolben abpipettiert, 10 ccm Pikrat-Pikrinsäurelösung (in 1 Liter sind 36 g Pikrinsäure und 500 ccm 1%ige Natronlauge enthalten) und 2 ccm 25%ige Natriumcarbonatlösung hinzugefügt. Diese Prüfungsflüssigkeit soll insgesamt 22 ccm betragen. Eine Vergleichsfärbung wird zugleich durch Anwendung von 10 ccm einer Vergleichs-Glucoselösung, 10 ccm der Pikrat-Pikrinsäurelösung und 2 ccm der 25%igen

<sup>1</sup> F. LARSEN: Acta med. scand. (Stockh.) 1929, **34**, 182; C. 1931, I, 1489.

<sup>2</sup> H. KRAMER u. A. STEINER: Biochem. Journ. 1931, **25**, 161.

<sup>3</sup> ST. R. BENEDICT and E. OSTERBERG: Journ. biol. Chemistry 1918, **34**, 195; C. 1919, II, 86.

<sup>4</sup> W. M. DEHN and F. A. HARTMANN: Journ. Amer. Chem. Soc. 1914, **36**, 403; Z. 1915, **29**, 442.

<sup>5</sup> W. THOMAS and R. A. DUTCHER: Journ. Amer. Chem. Soc. 1924, **46**, 1662; Z. 1925, **50**, 431.

Natriumcarbonatlösung bereitet. Beide mit Watte verschlossenen Kolben werden dann 10 Minuten im Wasserbade von 95° erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Vergleichslösung auf 35—70 ccm, je nach Menge des Zuckers, verdünnt und die colorimetrische Vergleichsmessung ausgeführt.

W. THOMAS<sup>1</sup> verwendet das Verfahren auch zur Bestimmung von Stärke und anderen Polysacchariden nach Hydrolyse. M. R. COE und G. L. BIDWELL<sup>2</sup> erhielten im Vergleich mit der Kupferreduktionsmethode bei Zucker und Stärke ebenfalls gute Ergebnisse.

### e) Andere Verfahren.

CH. F. POE und F. G. EDSON<sup>3</sup> schlagen zur colorimetrischen Bestimmung des Zuckers 2,4 Natriumdinitrophenolat in alkalischer Lösung von bestimmter Zusammensetzung vor. A. CASTIGLIONI<sup>4</sup> wertet die Reaktion von SELWANOW (vgl. S. 852) colorimetrisch aus und findet eine Genauigkeit von  $\pm 1\%$ . Über die Brauchbarkeit weiterer Methoden vgl. TH. G. PHILIPS<sup>5</sup>.

## Zuckerbestimmung durch Polarisation.

Das polarimetrische Verfahren zur Zuckerbestimmung zeichnet sich durch rasche Ausführbarkeit und dadurch aus, daß die verwendeten Lösungen nicht verbraucht, sondern für anderweitige Untersuchungen weiter verwendet werden können. Für die Ausführung des Verfahrens sind aber Vorbedingungen, daß

1. neben dem zu bestimmenden Zucker andere optisch aktive Stoffe in unbekannter Menge nicht vorliegen;

2. die zu prüfenden Lösungen hinreichend lichtdurchlässig und frei von Trübungen sind;

3. die zu prüfenden Lösungen so konzentriert hergestellt werden können, daß die optische Ablenkung hinreichend deutlich erkennbar ist.

Bei Vorliegen mehrerer Zuckerarten nebeneinander entspricht die optische Drehung der Summe der einzelnen unter Beachtung der Vorzeichen. Nach dem BIOTSchen Gesetze ist das Drehungsvermögen der Zuckerarten der Konzentration in der Lösung und der Länge der Flüssigkeitsschicht proportional.

Als Einheit der Drehung gilt die spezifische Drehung, d. h. die Ablenkung der Ebene des polarisierten Lichtes durch 100 g des betreffenden Zuckers in 100 ccm Lösung für eine 100 mm dicke Schicht. Praktisch wird fast allgemein das gelbe Natriumlicht zur Beleuchtung verwendet und die spezifische Drehung dann mit dem Zeichen  $[\alpha]_D^t$  bezeichnet, wobei  $t$  die Beobachtungstemperatur angibt.

Die verhältnismäßig geringe Lichtstärke einer einfachen Natriumchlorid-Bunsenflamme wird durch Verwendung einer neuen elektrischen Natriumlichtquelle<sup>6</sup> der Osram-Gesellschaft (S. 393) auf etwa den 20fachen Wert gesteigert. Dadurch erübrigt sich im allgemeinen die Anwendung von weißem Licht für dunklere Lösungen, das etwas, nach HETPER<sup>7</sup> im Mittel um das 1,28fache, größere Ablenkungen bewirkt. Vgl. S. 393.

Über Polarisationsapparate vgl. S. 368. Die Ablesungen erfolgen je nach der Skalenteilung des Apparates entweder in Kreisgraden oder in sog. VENTZKE-Graden. VENTZKE hat mit  $+100^\circ$  jenes Drehungsvermögen bezeichnet, das eine 200 mm lange Schicht einer Saccharoselösung vom spezifischen Gewicht (17,5°/17,5°) 1,100 zeigt. Eine solche Lösung enthält 26,048 g Zucker

<sup>1</sup> W. THOMAS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1924, **46**, 1670; Z. 1925, **50**, 432.

<sup>2</sup> M. R. COE u. G. L. BIDWELL: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1924, **64**, 671; Z. 1925, **80**, 54.

<sup>3</sup> CH. F. POE u. F. G. EDSON: Ind. Engin. Chem. Analyt. Edit. 1932, **4**, 300.

<sup>4</sup> A. CASTIGLIONI: Ann. Chim. analyt. appl. 1932, **22**, 570.

<sup>5</sup> TH. G. PHILIPS: Journ. Biol. Chem. 1932, **95**, 735; C. 1932, **I**, 3472.

<sup>6</sup> Vgl. Chem.-Ztg. 1931, **55**, 810; Chem. Fabrik 1932, **5**, 30.

<sup>7</sup> J. HETPER: Z. 1910, **19**, 633.

in 100 ccm bei 17,5° bezogen auf Wasser von 17,5° oder 26,000 g Zucker in 100 wahren Kubikzentimetern bei 20°. Vgl. S. 387.

Zur Umrechnung der VENTZKE-Grade in Kreisgrade (vgl. S. 388, nach WILD)<sup>1</sup> und umgekehrt dienen folgende Formeln:

$$\begin{aligned} 1 \text{ VENTZKE-Grad} &= 0,3462 \text{ Kreisgrade,} \\ 1 \text{ Kreisgrad} &= 2,888 \text{ VENTZKE-Grade.} \end{aligned}$$

Die Menge Saccharose, die — in 100 ccm gelöst und bei 20° im 200 mm-Rohre beobachtet — eine Ablenkung von 100° bewirkt, bezeichnet man als das Normalgewicht an Saccharose<sup>2</sup>. Es beträgt bei Apparaten mit Kreisgradteilung 75,00 g<sup>3</sup>, bei denen mit VENTZKE-Teilung also 26,000 g. — Die folgenden Angaben beziehen sich, soweit nichts Näheres angegeben ist, auf Kreisgrade und auf Beobachtung im 200 mm-Rohr.

### 1. Spezifische Drehungsvermögen der einzelnen Zuckerarten.

#### a) In wäßriger Lösung.

Die spezifische Drehung ist nicht nur von Art und Menge des in Lösung befindlichen Zuckers, sondern auch in kleinerem oder größerem Maßstabe von der Konzentration des Zuckers, der Beobachtungsdauer, der Art des Lösungsmittels, der Zubereitung der Lösung und selbst vom Zeitpunkte der Beobachtung abhängig. J. HETPER<sup>4</sup> hat diese Einflüsse systematisch an Hand der Literaturangaben durchgeprüft und für Saccharose vor und nach der Inversion

Tabelle 7.

| Zuckerart          | Einfluß des Lösungsmittels   | Multitrotation <sup>5</sup>                                 |
|--------------------|--|---|
| Saccharose . . .   | Alkohol verursacht eine ganz unbedeutende Erhöhung $[\alpha]_D = 66,83$ statt 66,67  | Keine Multirotation   |
| Glucose . . . . .  | Gegenwart von Salzsäure wirkt nicht störend; Kochen von mit Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuerten Lösungen erhöht das Drehungsvermögen | Zeigt Birotation .  |
| Fructose . . . . . | In neutraler Lösung ist die Drehung etwas kleiner als in mit Salzsäure angesäuerten, in alkoholischer um etwa $\frac{1}{3}$ verringert     | Zeigt Multirotation   |
| Lactose . . . . .  | Keine Angabe   | Zeigt Birotation  |
| Maltose . . . . .  | Keine Angabe   | Zeigt Semirotation, d. h. frische Lösungen drehen schwächer |
| Dextrin . . . . .  | Kein Einfluß festgestellt  | Keine Multirotation beobachtet                              |

<sup>1</sup> Außerdem werden noch LAURENT-Grade, von denen 1° 0,2167 Kreisgraden, und Grade WILD (Zuckerskala), von denen 1° 0,1328 Kreisgraden entspricht, verwendet.

<sup>2</sup> Die internationale Kommission für einheitliche Methoden der Zuckeruntersuchungen definiert die Normallösung wie folgt (vgl. S. 387): Man wägt 26,00 g reinen Zucker in der Luft mit Messinggewichten bei 20° ab und füllt in einem Kolben mit Wasser auf 100 metrische Kubikzentimeter auf.

<sup>3</sup> Nach früheren Angaben. — In Übereinstimmung mit der spezifischen Drehung von 66,502° (vgl. S. 388) würden sich 75,19 g berechnen.

<sup>4</sup> J. HETPER: Z. 1910, 19, 633.

<sup>5</sup> Zusatz von 0,1% Ammoniak oder 24stündiges Stehen hebt die Multitrotation auf. Größere Mengen von Ammoniak wirken schädlich auf die Drehung.

(S. 885), Invertzucker, Glucose, Fructose, Lactose und Maltose, ferner auch für Dextrin übersichtlich zusammengestellt. Wir geben seine Tabellen nachstehend wieder<sup>1</sup> und ergänzen sie durch kurze Angaben<sup>2</sup> über Mannose, Galaktose, Arabinose, Xylose und Rhamnose, um vorkommendenfalls bei Zuckermischungen auch diese Drehungen berücksichtigen zu können. Vorausgeschickt sei eine kurze Übersicht über die Einflüsse der Art des Lösungsmittels, insbesondere dessen Gehalt an Alkohol bei Saccharose, Glucose, Fructose, Lactose, Maltose und Dextrin und über die Beobachtungszeit (die Multirotation):

In den folgenden Tabellen von HETPER ist der Invertzucker durch Erwärmen von 75 ccm der Lösung mit 5 ccm 38%iger Salzsäure auf 67–70° dargestellt und die Lösung nach Auffüllen auf 100 ccm, rasch abgekühlt und in saurer Lösung polarisiert worden (vgl. bei Inversion der Saccharose S. 885).

Spezifisches Drehungsvermögen von Zuckerarten.

100 g der gegebenen Zuckerart in 100 ccm bei Benutzung eines 100 mm-Rohres.

Tabelle 8. Einfluß der Konzentration ( $p = g$  in 100 ccm) und der Temperatur.

| Zuckerart                      | 13°      | 14°      | 15°   | 16°   | 17°   | 18°   | 19°   | 20°   | 21°   | 22°   |
|--------------------------------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Saccharose . . . . .           | + 66,67  |          |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Saccharose nach der Inversion  | $p = 5$  | 23,45    | 23,12 | 22,79 | 22,45 | 22,12 | 21,79 | 21,45 | 21,12 | 20,79 |
|                                | $p = 10$ | 23,67    | 23,34 | 23,01 | 22,67 | 22,34 | 22,01 | 21,67 | 21,34 | 21,01 |
|                                | $p = 15$ | 23,89    | 23,56 | 23,23 | 22,89 | 22,56 | 22,23 | 21,89 | 21,56 | 21,23 |
| Invertzucker                   | $p = 5$  | 22,28    | 21,96 | 21,65 | 21,33 | 21,01 | 20,70 | 20,37 | 20,06 | 19,75 |
|                                | $p = 10$ | 22,80    | 22,49 | 22,17 | 21,86 | 21,53 | 21,22 | 20,91 | 20,59 | 20,27 |
|                                | $p = 15$ | 22,70    | 22,38 | 22,07 | 21,75 | 21,43 | 21,12 | 20,80 | 20,48 | 20,17 |
| Glucose . . . . .              | $p = 5$  | + 52,61  |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                                | $p = 10$ | + 52,74  |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                                | $p = 15$ | + 52,90  |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Fructose . . . . .             | $p = 5$  | 97,06    | 96,42 | 95,78 | 95,14 | 94,50 | 93,86 | 93,22 | 92,58 | 91,94 |
|                                | $p = 10$ | 97,62    | 96,98 | 96,34 | 95,70 | 95,06 | 94,42 | 93,78 | 93,14 | 92,50 |
|                                | $p = 15$ | 98,21    | 97,57 | 96,93 | 96,29 | 95,65 | 95,01 | 94,37 | 93,73 | 93,09 |
| Lactose . . . . .              |          | 55,66    | 55,60 | 55,54 | 55,48 | 55,42 | 55,36 | 55,30 | 55,24 | 52,18 |
| Maltose . . . . .              |          | + 137,50 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Dextrin <sup>3</sup> . . . . . |          | + 194,80 |       |       |       |       |       |       |       |       |

Das spezifische Drehungsvermögen der übrigen Zuckerarten kann für  $p = 10$  und  $t = 20^\circ$ , wie folgt<sup>4</sup>, eingesetzt werden:

|                   |   |            |   |                     |           |                              |
|-------------------|---|------------|---|---------------------|-----------|------------------------------|
| Mannose           | Galaktose   | Arabinose  | Xylose  | Rhamnose-<br>hydrat | Raffinose | Melezitose<br>(wasserfrei)   |
| + 14,0°           | + 80,7°   | + 104,4°   | + 18,8°   | + 8,6°              | + 104,5°  | + 88,55°                     |
| (V. D. HAAR)      |   | (BÖESEKEN) | (Mittelwert)  | (V. D. HAAR)        | (LANDOLT) | (V. FELLEBERG <sup>5</sup> ) |
| Berechnungsformel | $[\alpha]_D = 83,88$<br>+ 0,0785 $p$<br>– 0,209 $t$<br>(MEISSL) |            | $[\alpha]_D = + 18,09$<br>+ 0,06986 $p$<br>(SCHULZE u. TOLLENS) |                     |           |                              |

<sup>1</sup> Entsprechend den 1910 geltenden Grundwerten zeigen die Tabellen geringe Abweichungen von den heute gültigen. Der Einfluß auf das Ergebnis hierdurch dürfte jedoch für die praktische Lebensmitteluntersuchung vernachlässigbar klein sein.

<sup>2</sup> Nach LANDOLT-BÖRNSTEIN: Physikalisch-chemische Tabellen, 3. Aufl. 1905, Tafel 215.

<sup>3</sup> Bei besonders gereinigtem Honigdextrin fand v. FELLEBERG (Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1933, 24, 370) die spezifische Drehung zu + 160,7 (aus Coniferenhonig) und + 163,5° (aus Blütenhonig).

<sup>4</sup> Vgl. auch S. 400 und VAN DER HAAR: Anleitung S. 14–17.

<sup>5</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1933, 24, 376.

Die folgende Tabelle 9 gibt die Drehung für je 1 g der betreffenden Zuckerart an:

Tabelle 9.

1 g der gegebenen Zuckerart in 100 ccm verursacht unter Anwendung eines 200 mm-Rohres eine Drehung in Kreisgraden:

| Zuckerart                     | 13°      | 14°     | 15°    | 16°    | 17°    | 18°    | 19°    | 20°    | 21°    | 22°    |        |
|-------------------------------|----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Saccharose . . . . .          | + 1,333  |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Saccharose nach der Inversion | $p = 5$  | —0,4757 | 0,4691 | 0,4624 | 0,4557 | 0,4491 | 0,4424 | 0,4357 | 0,4291 | 0,4224 | 0,4157 |
|                               | $p = 10$ | —0,4801 | 0,4735 | 0,4668 | 0,4601 | 0,4535 | 0,4468 | 0,4401 | 0,4335 | 0,4268 | 0,4201 |
|                               | $p = 15$ | —0,4845 | 0,4779 | 0,4712 | 0,4645 | 0,4579 | 0,4512 | 0,4445 | 0,4379 | 0,4312 | 0,4245 |
| Invertzucker                  | $p = 5$  | —0,4520 | 0,4456 | 0,4392 | 0,4330 | 0,4266 | 0,4202 | 0,4140 | 0,4074 | 0,4012 | 0,3950 |
|                               | $p = 10$ | —0,4560 | 0,4498 | 0,4434 | 0,4372 | 0,4306 | 0,4244 | 0,4182 | 0,4118 | 0,4054 | 0,3992 |
|                               | $p = 15$ | —0,4604 | 0,4540 | 0,4476 | 0,4414 | 0,4350 | 0,4286 | 0,4224 | 0,4160 | 0,4096 | 0,4043 |
| Glucose . . . . .             | $p = 5$  | + 1,052 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|                               | $p = 10$ | + 1,054 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|                               | $p = 15$ | + 1,056 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Fructose . . . . .            | $p = 5$  | —1,954  | 1,941  | 1,928  | 1,916  | 1,903  | 1,890  | 1,877  | 1,864  | 1,853  | 1,839  |
|                               | $p = 10$ | —1,965  | 1,952  | 1,940  | 1,927  | 1,914  | 1,901  | 1,888  | 1,876  | 1,863  | 1,850  |
|                               | $p = 15$ | —1,977  | 1,964  | 1,951  | 1,939  | 1,926  | 1,913  | 1,900  | 1,887  | 1,875  | 1,862  |
| Lactose . . . . .             |          | +1,114  | 1,113  | 1,112  | 1,111  | 1,110  | 1,108  | 1,107  | 1,106  | 1,105  | 1,104  |
| Maltose . . . . .             |          | + 2,750 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Dextrin . . . . .             |          | + 3,896 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |

Umgekehrt zeigt folgende Übersicht den je einem Kreisgrad entsprechenden Zuckergehalt:

Tabelle 10.

Ein Kreisgrad entspricht unter Anwendung eines 200 mm-Rohres Gramm der gegebenen Zuckerart in 100 ccm.

| Zuckerart                     | 13°      | 14°    | 15°    | 16°    | 17°    | 18°    | 19°    | 20°    | 21°    | 22°    |        |
|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Saccharose . . . . .          | 0,7500   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Saccharose nach der Inversion | $p = 5$  | 2,102  | 2,132  | 2,163  | 2,194  | 2,227  | 2,260  | 2,295  | 2,330  | 2,367  | 2,405  |
|                               | $p = 10$ | 2,083  | 2,112  | 2,142  | 2,173  | 2,205  | 2,238  | 2,272  | 2,307  | 2,343  | 2,380  |
|                               | $p = 15$ | 2,064  | 2,093  | 2,122  | 2,153  | 2,184  | 2,216  | 2,249  | 2,284  | 2,319  | 2,355  |
| Invertzucker                  | $p = 5$  | 2,213  | 2,245  | 2,277  | 2,309  | 2,345  | 2,380  | 2,417  | 2,453  | 2,492  | 2,532  |
|                               | $p = 10$ | 2,193  | 2,224  | 2,256  | 2,288  | 2,322  | 2,357  | 2,392  | 2,429  | 2,467  | 2,506  |
|                               | $p = 15$ | 2,173  | 2,204  | 2,235  | 2,267  | 2,300  | 2,333  | 2,368  | 2,405  | 2,442  | 2,480  |
| Glucose . . . . .             | $p = 5$  | 0,9504 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|                               | $p = 10$ | 0,9481 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|                               | $p = 15$ | 0,9452 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Fructose . . . . .            | $p = 5$  | 0,5118 | 0,5151 | 0,5186 | 0,5220 | 0,5256 | 0,5291 | 0,5327 | 0,5363 | 0,5401 | 0,5438 |
|                               | $p = 10$ | 0,5089 | 0,5122 | 0,5155 | 0,5190 | 0,5225 | 0,5260 | 0,5296 | 0,5332 | 0,5368 | 0,5404 |
|                               | $p = 15$ | 0,5058 | 0,5091 | 0,5124 | 0,5159 | 0,5193 | 0,5227 | 0,5263 | 0,5298 | 0,5335 | 0,5371 |
| Lactose . . . . .             |          | 0,8963 | 0,8983 | 0,8993 | 0,9003 | 0,9014 | 0,9023 | 0,9032 | 0,9041 | 0,9051 | 0,9061 |
| Maltose . . . . .             |          | 0,3644 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Dextrin . . . . .             |          | 0,2576 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |

Über weitere den VENTZKE-Graden entsprechende tabellarische Übersicht vgl. die Originalarbeit.

Über die Berechnung des Saccharose- und Invertzuckergehaltes aus der Drehungsverminderung nach der CLERGETSchen Formel vgl. bei Saccharose, S. 886.

## b) Drehung der Zuckerarten bei Gegenwart von Natriumbisulfit.

J. TOMODA und T. TAGUCHI<sup>1</sup> fanden, daß durch Natriumbisulfit die Drehung einiger Zucker sehr stark, die anderer nur wenig beeinflusst wird. So betrug die Wirkung von 30 g Natriumbisulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ) auf 5 g des betreffenden Zuckers in 100 ccm der Lösung bei Beobachtung im 200 mm-Rohr<sup>2</sup>:

Tabelle 11.

| Zucker             | Drehungswert ohne Zusatz |             | Drehungswert bei Bisulfitzusatz |             | Drehungsverminderung (a-b) | Entsprechend in Kreisgraden | $\frac{b}{a} \cdot 100$ |
|--------------------|--------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|                    | (a) VENTZKE-Grade        | Kreis-Grade | (b) VENTZKE-Grade               | Kreis-Grade |                            |                             |                         |
| Glucose . . . .    | + 15,4                   | + 5,34      | - 0,3                           | - 0,10      | + 15,7                     | + 5,44                      | - 2,0                   |
| Xylose . . . .     | + 5,4                    | + 1,87      | + 0,0                           | + 0,00      | + 5,4                      | + 1,87                      | 0,0                     |
| Arabinose . . . .  | + 28,5                   | + 9,89      | + 2,1                           | + 0,72      | + 26,4                     | + 9,17                      | 7,4                     |
| Galaktose . . . .  | + 22,9                   | + 7,94      | + 3,5                           | + 1,21      | + 19,4                     | + 6,73                      | 15,3                    |
| Lactose . . . .    | + 15,4                   | + 5,34      | + 4,3                           | + 1,49      | + 11,1                     | + 3,85                      | 27,9                    |
| Maltose . . . .    | + 37,2                   | + 12,91     | + 30,9                          | + 10,72     | + 6,3                      | + 2,19                      | 83,0                    |
| Mannose . . . .    | + 4,4                    | + 1,53      | + 4,1                           | + 1,42      | + 0,3                      | + 0,11                      | 93,1                    |
| Saccharose . . . . | + 19,2                   | + 6,66      | + 18,7                          | + 6,49      | + 0,5                      | + 0,17                      | 97,4                    |
| Raffinose . . . .  | + 29,8                   | + 10,34     | + 29,1                          | + 10,09     | + 0,7                      | + 0,25                      | 97,6                    |
| Dextrin . . . .    | + 46,3                   | + 16,06     | + 45,2                          | + 15,68     | + 1,1                      | + 0,38                      | 97,6                    |
| Fructose . . . .   | - 26,8                   | - 9,30      | - 26,5                          | - 9,19      | - 0,3                      | - 0,11                      | 98,9                    |

Den Einfluß der Konzentration von Natriumbisulfit (g in 100 ccm) auf die Drehung einer Lösung von 5 g Glucose in 100 ccm zeigt folgende Übersicht:

|                              |        |        |       |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\text{NaHSO}_3$ , g . . . . | 0      | 2,9    | 14,4  | 23,1  | 28,9  | 34,7  | 40,4  | 46,2  | 52,0  |
| VENTZKE-Grade . .            | +15,4  | +11,2  | +3,2  | +0,3  | -0,3  | -0,5  | -1,0  | -1,5  | -2,0  |
| Kreisgrade . . . .           | + 5,34 | + 3,89 | +1,11 | +0,10 | -0,10 | -0,17 | -0,34 | -0,52 | -0,69 |

Bei 10 g Glucose in 100 ccm

|                                |        |        |        |        |       |       |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| $\text{NaHSO}_3$ , g . . . . . | 0      | 2,9    | 5,8    | 11,6   | 17,3  | 23,1  |
| VENTZKE-Grade . . . . .        | +30,7  | +24,0  | +17,8  | +10,5  | +5,0  | +1,1  |
| Kreisgrade . . . . .           | +10,65 | + 8,33 | + 6,40 | + 3,64 | +1,73 | +0,38 |
| $\text{NaHSO}_3$ , g . . . . . | 28,9   | 34,7   | 40,4   | 46,2   | 52,0  |       |
| VENTZKE-Grade . . . . .        | -0,1   | -1,4   | -2,8   | -3,2   | -3,6  |       |
| Kreisgrade . . . . .           | -0,09  | -0,49  | -0,97  | -1,11  | -1,25 |       |

## 2. Klärung und Entfärbung der Zuckerlösungen.

Da der Lichtstrahl, der durch die Zuckerlösung im Polarisationsapparate geht, nicht nur durch grobdisperse Niederschläge, die man durch Filtration, gegebenenfalls durch Kieselguhr, abscheiden kann, sondern auch durch kolloide Trübungen sehr stark geschwächt wird, besteht eine der wichtigsten Vorbehandlungen der Zuckerlösungen darin, die Kolloide daraus zu entfernen. Eine derartige Vorbehandlung nennt man Klärung der zur Polarisation dienenden Lösungen. Diese Klärung besteht meistens darin, daß man die störenden Kolloide mit Schwermetallen, so besonders Blei, Eisen, Aluminium, Quecksilber usw. zu unlöslichen Niederschlägen verbindet und diese durch Filtrieren entfernt. Hierbei tritt jedoch nicht selten der Fall ein, daß auch diese an sich unlösliche Verbindung selbst infolge des Vorhandenseins von Schutzkolloiden als Sol gelöst bleibt, eine Koagulation bzw. Ausflockung nicht eintritt und die Lösung kolloid getrübt bleibt. In solchen Fällen kommt man oft, wie die Erfahrung gelehrt hat, durch Adsorption an ein anderes Kolloid von entgegengesetzter elektrischer Ladung zum Ziele. Derartige zur Klärung von Zucker-

<sup>1</sup> J. TOMODA and T. TAGUCHI: Journ. Soc. Chem. Ind. Japan 1930, **33**, 343.

<sup>2</sup> Mit-Umrechnung auf Kreisgrade (aus den von TOMODA u. TAGUCHI angegebenen VENTZKE-Graden).



lösungen geeignete Kolloide sind z. B. Bleitannat, Zinkferrocyanid, Tonerde, Eisenhydroxyd und andere.

Da auch die meisten natürlichen und künstlichen Farbstoffe sich in Wasser mehr oder weniger in kolloider Lösung befinden, ist mit allen diesen Klärmethoden auch mehr oder weniger eine Entfärbung verbunden, die stets erwünscht, aber auch oft notwendig ist, nämlich dann, wenn der betreffende Farbstoff das Licht bei dem beobachtet werden soll, z. B. das gelbe Natriumlicht, absorbiert.

Schließlich hat die Klärung noch die Aufgabe, nichtzuckerartige, optisch aktive Stoffe, wie einige organische Säuren, abzuscheiden.

Um die Klärwirkung zu unterstützen, empfiehlt es sich, zur Filtration der Niederschläge möglichst feinporige Filter zu verwenden und die Feinporigkeit der Kieselguhr<sup>1</sup> entsprechend auszunutzen. In der Praxis besonders bewährt haben sich folgende Klärverfahren:

**a) Behandlung mit Bleiessig.** Man fügt zu der zu untersuchenden Zuckerlösung soviel Bleiessig, bis kein weiterer Niederschlag entsteht, oder, da dies oft schwer zu erkennen ist, eine Menge, die auf Grund besonderer Versuche für den betreffenden Untersuchungsgegenstand ausreicht. Da aber ein Überschuß an Bleiessig unter Umständen ein Mitausfallen von Kohlenhydraten bedingen und auch zu Nachtrübungen durch die Kohlensäure der Luft Veranlassung geben kann, pflegt man den Überschuß durch Bleifällungsmittel wie Natriumsulfat oder Natriumphosphat bis auf eine sehr kleine Menge wieder abzuscheiden.

Von diesen Entbleiungsmitteln zeigt Dinatriumphosphat den Vorteil, nicht nur den Bleiüberschuß am vollständigsten abzuscheiden, sondern auch automatisch infolge der starken Pufferwirkung des Phosphates eine fast neutrale Reaktion hervorzubringen. Wahrscheinlich sind es auch diese beiden Umstände, die bewirken, daß bei Anwendung von Dinatriumphosphat die Zuckerverluste am geringsten sind. Nach Versuchen von D. T. ENGLIS und CHUK YEE TSANG<sup>2</sup> waren die Verluste durch die Bleifällung, die unter verschiedenen Bedingungen an Glucose 1–10%, an Fructose 1–35%, je nach Art der Entbleiung betragen, bei Verwendung von Dinatriumphosphat am geringsten. Besonders groß können die Verluste bei alkalischer Reaktion werden, weshalb Natriumcarbonat als Entbleiungsmittel zu verwerfen ist. Bleichlorid kann ebenfalls erhebliche Verluste an Invertzucker verursachen, wie W. FRESSENIUS und L. GRÜNHUT<sup>3</sup> fanden. Nach praktischen Erfahrungen ist die Klärwirkung bei Entbleiung mit Natriumsulfat oft besser als mit Natriumphosphat, was vielleicht damit zusammenhängt, daß die etwas größeren, mit ersteren in Lösung bleibenden Bleimengen eine vollständigere Ausfällung der störenden Stoffe (Kolloide) bewirken. Diese Bleimengen sind andererseits wieder so klein, daß sie den Zuckergehalt praktisch nicht in störendem Maße beeinflussen. W. FRESSENIUS und L. GRÜNHUT<sup>2</sup> berichten über gute Erfahrungen mit Natriumsulfat bei Weinuntersuchungen, die wir bei anderen Lebensmitteln ebenfalls bestätigen können.

Bleiessig fällt bei der Klärung die optisch aktiven organischen Säuren vollständig aus, weniger gut basische Stoffe, wie z. B. die Eiweißstoffe. Die Entfärbung ist im allgemeinen, besonders bei Pflanzenauszügen, erheblich. Oft beruht aber die Klärwirkung des Bleiessigs hierbei indes mehr oder weniger auf deren Gehalt von Gerbsäure, wodurch die günstige Wirkung von Bleitannat einsetzen kann.

<sup>1</sup> Vgl. S. 840.

<sup>2</sup> D. T. ENGLIS and CHUK YEE TSANG: Journ. Amer. Chem. Soc. 1922, 44, 865; Z. 1924, 48, 316.

<sup>3</sup> W. FRESSENIUS u. L. GRÜNHUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1920, 59, 424.

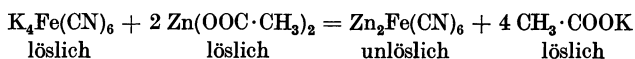
**b) Klärung mit Tannin und Bleiessig.** Diese von J. KARAS<sup>1</sup> zur Saccharinbestimmung und Untersuchung von Zuckercouleur, von W. SUTTHOFF und J. GROSSFELD<sup>2</sup> bei der Klärung von Rübensirup, bei der alle anderen Klärmittel versagten, mit Erfolg benutzten Klärmethode wurde von GROSSFELD<sup>3</sup> einer eingehenderen Prüfung unterzogen. Hierbei ergab sich, daß Saccharose, Invertzucker, Milchzucker nicht merklich, Stärkesirup in vernachlässigbarer Menge (etwa 1,5% der Gesamt-Drehung) käufliches Stärkedextrin in größerer Menge (etwa 10,8%) adsorbiert<sup>4</sup> wurden, wenn bei einer Zuckerverdünnung 1:10, je 10 ccm 10%ige Tanninlösung und Bleiessig verwendet wurden. Kolloide Stärke (Stärkekleister) wurde durch Bleitannat quantitativ zur Ausscheidung gebracht (vgl. S. 921).

Die Klärung kann praktisch so ausgeführt werden, daß man zu der Zuckerlösung, z. B. 50 ccm, je 10 ccm 10%ige Tanninlösung und 10 ccm Bleiessig fügt, nach jedesmaligem Zusatz gut umschüttelt und dann mit konz. Natriumsulfatlösung auf 100 ccm auffüllt und filtriert. In vielen Fällen genügen aber schon Zusätze von Bruchteilen dieser Klärmittelmengen.

Mit dieser Klärung ist eine viel stärkere Entfärbung der Lösungen als mit Bleiessig allein verbunden, die durch Wiederholung der Klärung mit dem Filtrat entsprechend gesteigert werden kann. Hierdurch gewinnt man oft die Möglichkeit, die Anwendung von Tierkohle, die leicht zu Zuckerverlusten durch Zuckeradsorption führt, als Entfärbungsmittel zu vermeiden.

Für die Anwendung der Bleitannatklärung auf vorstehende Weise muß die Zuckerlösung von neutraler oder fast neutraler Reaktion sein, also nötigenfalls vorher neutralisiert werden. In zu stark sauren Lösungen bleiben größere Bleimengen gelöst, die das Filtrat allmählich trüben. Für die Klärung saurer Lösungen eignet sich besser die folgende Methode. Eiweißstoffe werden durch Bleitannat nur unvollkommen gefällt, die Arbeitsweise ist daher z. B. zur Enteiweißung von Milchzubereitungen weniger geeignet.

**c) Klärung mit Kaliumferrocyanid und Zinkacetat.** Das von C. CARREZ<sup>5</sup> zur Klärung von Zuckerlösungen vorgeschlagene Verfahren besteht darin, daß man in der Lösung durch Kaliumferrocyanid und ein lösliches Zinksalz im Überschuß einen voluminösen unlöslichen Niederschlag von Zinkferrocyanid erzeugt, der die vorhandenen Kolloide — wahrscheinlich durch Adsorption, teils auch durch Ausfällung als unlösliche Zinkverbindungen — mitreißt. Als Zinksalz kann man Zinkacetat, Zinksulfat und Zinkchlorid verwenden. Nach der Gleichung



gelangen auf diese Weise außer dem überschüssigen Zinksalz nur das Kaliumsalz des an Zink gebunden gewesenen Anions in die Lösung, während die Ferrocyanwasserstoffsäure quantitativ wieder ausgeschieden wird.

CARREZ entfernt anschließend das gelöste Zink durch Neutralisation mit Natronlauge gegen Phenolphthalein, was aber nach unseren Erfahrungen die Klärwirkung selbst beeinträchtigt. Legt man aus besonderen Gründen Wert darauf, den Zinküberschuß wieder auszuschcheiden, so empfiehlt es sich, dies in der geklärten und filtrierten Lösung vorzunehmen. Für die meisten polarimetrischen Bestimmungen ist eine solche Zinkabscheidung unnötig.

<sup>1</sup> J. KARAS: Z. 1913, 25, 559.

<sup>2</sup> W. SUTTHOFF u. J. GROSSFELD: Z. 1914, 27, 183.

<sup>3</sup> J. GROSSFELD: Z. 1915, 29, 51.

<sup>4</sup> Hierbei ist zu berücksichtigen, daß Stärkedextrin noch Kolloide enthält, die mit ausgefällt werden; bei anderen Klärmethoden sind die Drehungsverluste bei Dextrin gewöhnlich höher, außer vielleicht bei der unter c) genannten.

<sup>5</sup> C. CARREZ: Ann. Chim. analyt. appl. 1909, 14, 187; Z. 1910, 20, 231.

Das Verfahren eignet sich am besten für schwach und stärker saure oder noch neutrale Lösungen, es versagt für solche von alkalischer Reaktion, die also vorher mit Essigsäure anzusäuern sind. Mineralsaure Flüssigkeiten spalten aus dem Niederschlag allmählich kleine Mengen Blausäure ab. Um dies zu verhindern, empfiehlt sich sofortige Filtration. Nach dem Reaktionsverlauf entfallen auf 1 Mol.  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O = 422,3$  g an

|                              |                                     |                       |                         |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Salz:                        | $Zn(OOC \cdot CH_3)_2 \cdot 2 H_2O$ | $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ | $ZnCl_2 \cdot 1,5 H_2O$ |
| Formel:                      | Zinkacetat                          | Zinksulfat            | Zinkchlorid             |
| 2 Mol. =                     | 439,0 g                             | 575,1 g               | 326,6 g                 |
| Also auf 100 Teile           |                                     |                       |                         |
| $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ : | 103,9                               | 136,2                 | 77,3 Teile              |

Um eine gute Klärung zu erhalten, verwendet man jedoch einen größeren Überschuß an Zinksalz, der an sich die Abscheidung zu befördern scheint. Nach unseren Erfahrungen gelingt die Klärung ausgezeichnet bei Zusatz gleicher Volumen einer Lösung von 150 g Kaliumferrocyanid im Liter und einer Lösung von 230 g Zinkacetat bzw. 300 g Zinksulfat im Liter. Die Größe der Volumen<sup>1</sup> selbst richtet sich nach der Art des Untersuchungsgegenstandes und ist von Fall zu Fall, nötigenfalls durch Vorversuch, zu ermitteln.

Bei dieser Klärung nach CARREZ werden Eiweißstoffe weit vollständiger als mit Bleiessig ausgefällt. Dagegen scheint aber die Entfernung mehr sauer reagierender Kolloide wie von Gummi und Schleim weniger sicher zu gelingen. Auch steht die Entfärbung hierbei der Klärung mit Tannin und Bleiessig nach.

d) **Sonstige Klärmethoden.**  $\alpha$ ) Zur Klärung von Honig ist verschiedentlich frisch gefällte Tonerde vorgeschlagen worden, deren Wirkung sich jedoch sehr nach ihrer physikalischen Beschaffenheit richtet; an Brauchbarkeit wird sie von dem unter c) genannten Verfahren erheblich übertroffen.

$\beta$ ) Den Vorschlag von MICHAELIS und RONA, zur Enteiweißung kolloide Eisenhydroxydlösungen zu verwenden, prüfte F. ZETZSCHE<sup>2</sup> nach und fand, daß sie auch für Caramellösungen geeignet ist, wenn man fehlendes Eiweiß vorher zusetzt — Eisenhydroxyd dürfte als basischer Körper in erster Linie saure Kolloide adsorbieren. Es eignet sich wie Tonerde am besten für schwach alkalische Lösungen.

$\gamma$ ) Für die Klärung von Milch zur polarimetrischen Milchzuckerbestimmung hat A. SCHEIBE<sup>3</sup> Quecksilberjodidlösung empfohlen; auch andere Quecksilberverbindungen hat man für Klärzwecke in Vorschlag gebracht. Ihrer allgemeinen Anwendung steht u. a. die starke Giftigkeit dieser Salze im Wege.

$\delta$ ) E. FEDER<sup>4</sup> empfiehlt zur Klärung von Milch auf 75 ccm Milch 6 ccm einer wäßrigen Lösung von 75 g Asaprol ( $\beta$ -Naphthol- $\alpha$ -monosulfosaurem Calcium) und 75 g Citronensäure in 250 ccm, ohne daß jedoch dieser Vorschlag bisher weiteren Eingang gefunden hat.

### 3. Berücksichtigung des Volumens des Unlöslichen.

Diese Berücksichtigung ist bei Polarisationen dann notwendig, wenn feste Stoffe mit unlöslichen Bestandteilen, besonders fetthaltige Lebensmittel, untersucht werden sollen. Diese Berücksichtigung erfolgt in gleicher Weise wie bei der Extraktbestimmung S. 840. — Das Volumen der Klärmittel pflegt man im allgemeinen zu vernachlässigen, deshalb, weil die dadurch bedingte Konzentrationsänderung in die allgemeine Grenze der Beobachtungsfehler fällt und auch durch geringe Adsorptionen der Zuckerarten selbst an die Klärmittel mehr oder weniger aufgehoben wird.

<sup>1</sup> CARREZ setzt zu 10 ccm Milch 40—60 ccm Wasser und je 2 ccm obiger Lösungen und füllt dann auf 100 ccm auf.

<sup>2</sup> F. ZETZSCHE: Pharm. Zentralh. 1910, 51, 287; Z. 1911, 21, 225.

<sup>3</sup> A. SCHEIBE: Zeitschr. analyt. Chem. 1898, 37, 24.

<sup>4</sup> E. FEDER: Z. 1914, 28, 20.

## D. Bestimmung der Pentosen.

Die Bestimmung der Pentosen im allgemeinen, sowie der Methylpentosen wird nach den gleichen Arbeitsvorschriften wie bei Pentosanen (S. 928) und Methylpentosanen (S. 934) vorgenommen.

Für die Bestimmung der Arabinose als Diphenylhydrazon haben C. NEUBERG und J. WOHLGEMUTH<sup>1</sup> außerdem folgende Vorschrift angegeben: Man versetzt 30 ccm der zu prüfenden Zuckerlösung mit 1 Tropfen konz. Essigsäure, dann mit soviel Diphenylhydrazin, gelöst in etwa 50 ccm 96%igem Alkohol, wie zur Bindung sämtlicher vorhandenen Zucker genügt, und erhitzt 30 Minuten unter Ersatz des verdampfenden Alkohols. Das Gemisch läßt man bis zum folgenden Tage stehen, filtriert die gebildeten Krystalle ab, wäscht mit 50 ccm 50%igem Alkohol nach, trocknet bei 80° und wägt. Die Menge des Hydrazons, mal 0,4747, ergibt die Menge der vorhandenen Arabinose. Wenn die Lösung weniger als 1% Arabinose enthält, wird sie vorher durch Eindampfen konzentriert.

## E. Bestimmung der Disaccharide.

### 1. Bestimmung der Saccharose.

Bei der Bestimmung der Saccharose in Lebensmitteln hat man zu unterscheiden, ob neben Saccharose noch sonstige Kohlenhydrate vorhanden sind oder nicht, was man am einfachsten durch Erhitzen der zu prüfenden Lösung mit FEHLINGScher Lösung feststellt. Wenn sich dabei kein Kupferoxydul abscheidet, sondern diese Abscheidung erst nach Erwärmen mit Salzsäure und darauffolgender Neutralisation sowie Erhitzen mit FEHLINGScher Lösung eintritt, kann die Abwesenheit von sonstigen Zuckerarten angenommen werden.

Da vorhandene Saccharose durch Säuren und Invertase allmählich in Invertzucker zerfällt, muß in säure- und invertasehaltigen Flüssigkeiten (Wein) die Prüfung auf Saccharose unverzüglich vorgenommen oder die Inversion durch genaue Neutralisation und Erhitzen (15 Minuten auf 80°) zum Stehen gebracht werden.

#### 1. Saccharosebestimmung bei Abwesenheit sonstiger Kohlenhydrate.

Die Bestimmung erfolgt am einfachsten polarimetrisch (S. 875). Man wägt soviel des zu prüfenden Stoffes ab, wie dem Normalgewicht des betreffenden Apparates entspricht, löst in Wasser, füllt nötigenfalls nach Klärung auf 100 ccm auf und polarisiert.

Das Normalgewicht beträgt in 100 ccm Lösung (vgl. S. 876) für den Polarisationsapparat von:

MITSCHERLICH, LAURENT, SCHMIDT & HAENSCH, WILD mit Kreisgradteilung . . . 75 g<sup>2</sup>  
SOLEIL-VENTZKE-SCHEIBLER, SCHMIDT & HAENSCH mit Zuckerskala . . . . . 26 g

Polarisiert man diese Lösungen im 200 mm-Rohr, so bedeutet 1° Drehung 1% Saccharose; nur bei den Apparaten mit Kreisgradteilung würde eine Lösung, welche 75 g Saccharose in 100 ccm Lösung enthält, zu konzentriert sein; man verwendet daher schwächere Lösungen, z. B. solche mit 30 g Substanz in 100 ccm und muß dann die gefundenen Grade mit 2,5 multiplizieren, um den Saccharosegehalt zu finden.

<sup>1</sup> C. NEUBERG u. J. WOHLGEMUTH: Zeitschr. physiol. Chem. 1902, **35**, 31; C. 1902, I, 985—987.

<sup>2</sup> Nach früheren Angaben. — Der spez. Drehung von 66,502° (vgl. S. 388) entsprechen 75,19 g. Vgl. Anmerkung 3, S. 876.

## 2. Saccharosebestimmung bei Gegenwart anderer Zucker.

### a) Bestimmung nach Zerstörung der reduzierenden Zucker durch Alkali- oder Erdalkalihydroxyde.

Durch Behandlung der Zuckerlösung mit Alkalien lassen sich die reduzierenden Zuckerarten in optisch inaktive Stoffe umwandeln, während die Saccharose (und Melezitose, vgl. S. 860) unverändert bleiben. A. JOLLES<sup>1</sup> erreichte diese Umwandlung vollständig bereits mit 0,01 N.-Alkalilauge bei 37–38° in 24 Stunden, während die Saccharose noch nach 336 Stunden ihre unveränderte Drehung zeigte.

Nach P. LEMELAND<sup>2</sup> wird Saccharose auch beim Erhitzen mit Natronlauge und Wasserstoffsperoxyd nicht angegriffen, wenn Braunstein zugegen ist. Allerdings stellte er fest, daß auch Maltose dabei nicht oxydiert wurde.

B. BARDACH und S. SILBERSTEIN<sup>3</sup> und C. BAKKER<sup>4</sup> (für Honig) bestätigten die Brauchbarkeit des Verfahrens von JOLLES. A. BEHRE und A. DÜRING<sup>5</sup> fanden später jedoch, daß ein Erhitzen der Zuckerlösung mit Barium- oder Calciumhydroxyd vorteilhafter ist. Nach BEHRE und DÜRING kann man, wie folgt, verfahren:

Eine abgewogene Menge des zu untersuchenden Stoffes<sup>6</sup> wird in einem langhalsigen 100 ccm-Kölbchen mit 50 ccm Wasser gelöst oder vermischt. Dann werden 1,2 g vorher geglühtes Calciumoxyd hinzugefügt und der Kolbeninhalt auf etwa 70 ccm aufgefüllt und mit eintauchendem Thermometer unter häufigem Schütteln 1 Stunde hindurch auf 80° erhitzt. Nach dem Erkalten wird neutralisiert, wozu etwa 7 ccm verdünnte Schwefelsäure (1 + 4) erforderlich<sup>7</sup> sind, mit 5 ccm Bleiessig versetzt, durchgeschüttelt, 1 ccm Natriumphosphatlösung hinzugefügt, bei 15° bis zur Marke aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und filtriert. Das Filtrat wird im 200 mm-Rohr, bei ungenügender Durchsichtigkeit im 100 mm-Rohr, bei 20° polarisiert.

Da auch Lactose durch das Verfahren vollständig inaktiviert wird, empfiehlt es sich nach H. FINCKE<sup>8</sup> besonders auch zur Saccharosebestimmung in Schokoladen-, Kakao- und Milchzubereitungen zur Beseitigung der durch die Drehung des Milchezuckers verursachten Störung. FINCKE empfiehlt aber nicht von dem zu prüfenden Stoffe direkt, sondern von dessen mit Bleiessig geklärter Lösung auszugehen und setzt für den aus 1 g Calciumoxyd und 2 ccm Bleiessig<sup>9</sup> entstehenden Niederschlag 1,4 ccm Volumenkorrektur (vgl. S. 840) ein.

Aus der durch das Erhitzen mit Alkali erfolgenden Drehungsabnahme von Zuckerlösungen läßt sich aber auch bei Einhaltung einer genauen Polarisations-temperatur (20°) indirekt der Gehalt an Nicht-Saccharose berechnen. Vgl. FINCKE<sup>8</sup>.

Nach unseren Versuchen an Stärkesirup ist das Verfahren bei Gegenwart erheblicher Mengen von Dextrinen nicht anwendbar, weil diese durch die obige Behandlung nicht genügend abgebaut werden.

<sup>1</sup> A. JOLLES: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, **20**, 567; Z. 1912, **23**, 457.

<sup>2</sup> P. LEMELAND: Journ. Pharm. et Chim. 1910 (7), **2**, 298; Z. 1912, **23**, 147.

<sup>3</sup> B. BARDACH u. S. SILBERSTEIN: Z. 1911, **21**, 540.

<sup>4</sup> C. BAKKER: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1921, **40**, 600; C. 1921, IV, 1335.

<sup>5</sup> A. BEHRE u. A. DÜRING: Z. 1922, **44**, 65.

<sup>6</sup> Mit höchstens 20 g Invertzucker oder sonstigem reduzierendem Zucker.

<sup>7</sup> Die nötige Menge stellt man durch besonderen Versuch mit 1,2 g Kalk und der Säure fest.

<sup>8</sup> H. FINCKE: Z. 1925, **50**, 351.

<sup>9</sup> Als Zusatz auf 50 ccm Lösung unter Auffüllen auf 100 ccm.

b) Bestimmung durch Polarisation der Zuckerlösung vor und nach der Inversion.

Unter Inversion versteht man die hydrolytische Zerlegung des Saccharosemoleküls in je 1 Molekül Glucose und Fructose, wobei 1 Molekül Wasser aufgenommen wird. N. SCHOORL<sup>1</sup> hat gezeigt, daß die Inversion unter Kontraktion des Zuckers erfolgt. Er findet für das spezifische Volumen des Invertzuckers bei Inversion mit Oxalsäure 0,6214, mit Invertase 0,6216, während sich ohne Kontraktion 0,638 berechnen würden. Das spezifische Volumen der Saccharose beträgt nach ihm 0,619, so daß durch die Inversion das spezifische Gewicht der Lösung etwas mehr erhöht wird, als dem Zuckergehalte entspricht. Doch ist diese Erhöhung so gering, daß die für Saccharose geltenden Extrakttabellen ohne erheblichen Fehler auch für Invertzucker verwendet werden können (vgl. S. 839).

Allgemeiner Verlauf der Inversion nach R. HAMMERSCHMIDT<sup>2</sup>. Ist  $a$  die Menge der in einer Lösung vorhandenen Säure,  $b$  die des Zuckers, so ist der in dem Zeitelement  $dt$  zersetzte Anteil des Zuckers  $dx$  proportional dem Produkt aus der Masse der Säure und der des unzersetzten Zuckers (Massenwirkungsgesetz), also:

$$\frac{dx}{dt} = ca(b-x),$$

worin  $c$  eine Konstante ist. Integriert ergibt die Gleichung:

$$-1(b-x) = cat - 1b,$$

worin  $1$  den natürlichen Logarithmus bedeutet. Durch Umrechnung auf BRIGGSsche Logarithmen kommt man zu der Form:

$$\log(b-x) = \log b - kt$$

oder 
$$\log \frac{b-x}{b} = -kt.$$

In dieser Gleichung ist  $k$ , mit 10000 multipliziert, die Inversionskonstante  $C$ . Zur Berechnung, wieviel an Invertzucker  $x$  und wieviel an Saccharose  $(b-x)$  noch in einer Flüssigkeit vorhanden ist, setze man  $-k = \log k_1$ :

$$\log \frac{b-x}{b} = t \log k_1$$

oder 
$$\frac{b-x}{b} = k_1^t.$$

Daraus folgt:

Unveränderte Saccharose:  $b-x = bk_1^t$ , Invertierte Saccharose:  $x = b(1-k_1^t)$ .

Während also die Zeit in arithmetischer Reihe wächst, nimmt die Menge des Rohrzuckers in geometrischer Reihe ab.

Bei gleichem Verhältnis von Wasser: Säure wird die Inversionskonstante durch die wachsende Zuckermenge nicht beeinflusst.

HAMMERSCHMIDT hat für Bromwasserstoffsäure folgende Temperaturkonstanten von  $C$  abgeleitet:

$$C = (1,17123 - 0,00044777t)^{t-9,7}.$$

Hieraus berechnet sich für

|                  |       |       |      |      |      |      |       |       |        |       |
|------------------|-------|-------|------|------|------|------|-------|-------|--------|-------|
| Temperatur $t =$ | 0°    | 9,7°  | 10°  | 15°  | 20°  | 25°  | 40°   | 55°   | 70°    | 100°  |
| Konstante $C =$  | 0,216 | 1,000 | 1,05 | 2,22 | 4,73 | 9,69 | 75,35 | 491,5 | 2685,0 | 46240 |

Durch Versuch gefunden wurden bei 25°: 9,67, 40°: 75,35, 55°: 491,5.

Die Konstante wächst für

|        |        |        |        |
|--------|--------|--------|--------|
|        | 0—10°  | 30—40° | 70—80° |
| um das | 5fache | 4fache | 3fache |

Die Zeit, in der eine praktisch völlige Inversion (bis auf 0,003%) eingetreten ist, ist etwa 15mal so groß wie die zur halben Inversion. Diese Zeit zur praktisch völligen Inversion berechnet sich nach der Formel

$$T = \frac{45\,154,500}{C}.$$

<sup>1</sup> N. SCHOORL: Z. 1920, 39, 113.

<sup>2</sup> R. HAMMERSCHMIDT: Zeitschr. Vers. f. Rübenzucker-Ind. 1890, 40, 465.

$\alpha$ ) Inversion für die polarimetrische Saccharosebestimmung. Zur Vornahme der Inversion einer Zuckerlösung sind verschiedene Vorschläge gemacht worden, die einerseits eine möglichst vollständige Umwandlung des Saccharose in Glucose und Fructose, andererseits aber auch möglichste Schonung besonders der gegen Säure empfindlichen Fructose (vgl. S. 860) bezwecken. Die wichtigsten dieser Vorschläge sind:

$\alpha\alpha$ ) Inversion mit starker Salzsäure. Diese auch der CLERGETSchen Formel zugrunde liegende meist übliche Arbeitsweise, die von A. HERZFELD und J. DAMMÜLLER<sup>1</sup> stammt, besteht darin, daß man 75 ccm Zuckerlösung mit 5 ccm 38% iger Salzsäure vermischt, in etwa 2 $\frac{1}{2}$  Minuten auf 67–70° erwärmt, 7 $\frac{1}{2}$  Minuten bei dieser Temperatur hält, auf 100 ccm verdünnt und dann rasch abkühlt und auf genau 100 ccm einstellt. Die so erhaltene Lösung dient — ohne Neutralisierung — zur Polarisation.

Aus dem Polarisationswerte vor und nach der Inversion läßt sich die vorhandene Saccharose genau berechnen. Bedeutet nämlich, bezogen auf eine Lösung des Normalgewichtes (vgl. S. 876) Zucker in 100 ccm und polarisiert im 200 mm-Rohr,  $P$  die Polarisation vor der Inversion,  $I$  die nach der Inversion,  $t$  die Temperatur und  $C$  eine Konstante, so heißt die CLERGETSche Formel für die vorhandene Saccharose ( $Z$ )<sup>2</sup>:

$$Z = \frac{100 (P - I)}{C - \frac{1}{2} t}$$

Man hat sich nach J. HETPER<sup>3</sup> für die Konstante  $C$  dahin geeinigt, unter Berücksichtigung der Zuckerkonzentration  $p$ , den Ausdruck

$$C = 141,8 + 0,066 p$$

einzusetzen, wodurch folgende Formel entsteht:

$$Z = \frac{100 (P - I)}{141,8 + 0,66 p - 0,5 t}$$

Die Salzsäure erhöht etwas die Linksdrehung des Invertzuckers. Für die Anwendung der CLERGETSchen Formel zur Berechnung der Saccharose ist zu berücksichtigen, daß aus 100 g Saccharose 105,3 g Invertzucker entstehen, daß also die dem Normalgewicht der Saccharose von 75 g entsprechende Menge Invertzucker 78,975 g beträgt. — Bei Einwaage kleinerer Mengen Substanz als 75 g auf 100 ccm rechnet man die gefundenen Polarisationswerte zunächst auf 75 g um<sup>4</sup> und kann dann obige Formel anwenden.

<sup>1</sup> A. HERZFELD u. J. DAMMÜLLER: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1888, **25**, 742; nach W. FRESSENIUS u. L. GRÜNHUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1920, **59**, 423.

<sup>2</sup> Die Ableitung der Formel und des Zahlenwertes ist folgende: Eine Saccharoselösung mit der Drehung +100° VENTZKE (vgl. S. 875) zeigte nach der Inversion eine Linksdrehung von 32,66° bei 20° und 42,66° bei 0°. Die Drehungsverminderung infolge der Inversion betrug also:

|      |        |        |              |
|------|--------|--------|--------------|
| bei: | 0°     | 20°    | allgemein    |
|      | 142,66 | 132,66 | 142,66—0,5 t |

Bezeichnet ( $P - I$ ) die gefundene Drehungsverminderung des zu untersuchenden Zuckers und  $Z$  den Prozentgehalt desselben an Saccharose, so verhält sich:

$$Z : (P - I) = 100 : (142,66 - 0,5 t)$$

$$Z = \frac{P - I}{142,66 - 0,5 t}$$

Für die Konstante  $C$  haben R. JACKSON und C. L. GILLIS (Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1920, **57**, 521; **Z.** 1922, **44**, 223) den etwas höheren Wert von 143,25 (Drehung bei 20° nach Inversion — 33,25°) gefunden. — Für vollständig neutralisierte Lösungen wird die Konstante  $C$  zu 144 angegeben.

<sup>3</sup> J. HETPER: **Z.** 1910, **19**, 635. — Die Vereinbarung erfolgte durch CREYT, LANDOLT, DAMMÜLLER, WOHL u. a.

<sup>4</sup> Bei 15 g Einwaage, z. B. durch Malnehmung mit 5 bei 30 g mit 2,5.

Folgende Tafel von HETPER<sup>1</sup> erleichtert die Berechnung des Drehungsvermögens der Saccharose vor der Inversion sowie des Gehaltes an Saccharose und der entsprechenden Menge Invertzucker für die Polarisationstemperaturen 13–22°<sup>2</sup> und verschiedene Konzentrationen außerordentlich. Die darin enthaltenen Zahlen sind nur mehr mit der Drehungsverminderung durch die Inversion zu multiplizieren, um den gesuchten Saccharosegehalt (in Gramm in 100 ccm) zu liefern.

Tabelle 12. Faktoren zur Berechnung der Saccharose aus der Drehungsdifferenz.

| Berechnung von                  | 13°    | 14°    | 15°    | 16°    | 17°    | 18°    | 19°    | 20°    | 21°    | 22°    |        |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Saccharose                      | $p=5$  | 0,5530 | 0,5550 | 0,5571 | 0,5592 | 0,5613 | 0,5634 | 0,5655 | 0,5676 | 0,5697 | 0,5718 |
|                                 | $p=10$ | 0,5516 | 0,5537 | 0,5557 | 0,5578 | 0,5599 | 0,5620 | 0,5641 | 0,5662 | 0,5684 | 0,5705 |
|                                 | $p=15$ | 0,5503 | 0,5523 | 0,5544 | 0,5564 | 0,5585 | 0,5606 | 0,5627 | 0,5648 | 0,5669 | 0,5691 |
| entsprech.<br>Invert-<br>zucker | $p=5$  | 0,5823 | 0,5844 | 0,5866 | 0,5888 | 0,5910 | 0,5932 | 0,5954 | 0,5977 | 0,6000 | 0,6022 |
|                                 | $p=10$ | 0,5809 | 0,5830 | 0,5852 | 0,5874 | 0,5896 | 0,5918 | 0,5940 | 0,5962 | 0,5985 | 0,6007 |
|                                 | $p=15$ | 0,5795 | 0,5816 | 0,5837 | 0,5859 | 0,5881 | 0,5903 | 0,5925 | 0,5947 | 0,5970 | 0,5992 |

Wie aus obigen Ausführungen hervorgeht, wird die Inversionsgeschwindigkeit von dem Säuregehalt fast gradlinig, von der Temperatur entsprechend dem Auftreten von  $t$  in der Inversionsgleichung (S. 885) im Potenzexponenten erheblich stärker beeinflusst. Hieraus folgt aber, daß bei niedriger Temperatur sich die Inversion langsamer und unter besserer Kontrolle verfolgen läßt, abgesehen von der Vermeidung von Störungen durch die Einwirkung heißer Mineralsäuren auf Begleitstoffe des Zuckers. Außerdem entstehen bei niedriger Temperatur weniger Reversionsprodukte aus dem Zucker selbst, wie nach F. W. ZERBAN und C. A. GAMBLE<sup>3</sup> schon die Durchführung der Inversion bei 60°, besonders an Zuckerrohrabläufen, erkennen ließ. Die Kenntnis, bei welcher niedriger Temperatur und in welcher zugehörigen Zeit eine praktisch völlige Inversion eintritt, kann daher von großem Nutzen sein<sup>4</sup>.

Angaben über diese Zeit im Zusammenhang mit Temperatur und Salzsäurekonzentration liegen ebenfalls von HAMMERSCHMIDT vor, so für 5 ccm 38%ige Salzsäure in 100 ccm:

| Temperatur | Inversionszeit<br>Minuten | Temperatur | Inversionszeit<br>Minuten | Temperatur | Inversionszeit<br>Minuten |
|------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|---------------------------|
| 0          | 62740 = 43,6 Tage         | 35         | 349,4 = 5,82 Stunden      | 70         | 5,1                       |
| 10         | 13540 = 9,4 „             | 40         | 179,8 = 3,00 „            | 80         | 1,8                       |
| 15         | 6105 = 4,2 „              | 50         | 50,5                      | 90         | 0,69                      |
| 20         | 2853 = 47,6 Stunden       | 60         | 15,3                      | 100        | 0,29                      |
| 25         | 1397 = 23,3 „             |            |                           |            |                           |

Durch einfaches Stehenlassen bei 20° für 48 Stunden erreicht man also eine gleich vollständige Inversion wie durch 5 Minuten bei 70°. In der Tat fand auch PRAGER nach HERZFELD<sup>5</sup> nach 24, 48 und 72 Stunden bei 25° genau das gleiche Polarisationsergebnis.

Um die bei der Inversion der Saccharose in die Zuckerlösung gelangenden größeren Mengen der Salzsäure, die bei der weiteren Untersuchung bisweilen

<sup>1</sup> Vgl. S. 876.

<sup>2</sup> Für die Polarisation nach der Inversion geltend.

<sup>3</sup> F. W. ZERBAN u. C. A. GAMBLE: Ind. Engin. Chem. Analyt. Edition 1933, 5, 34.

<sup>4</sup> Für die praktische Ausführung der Inversion empfiehlt es sich, die Raumtemperatur während des Inversionsvorganges mit einem Maximum-Minimumthermometer zu kontrollieren und die Zeitdauer der Säureeinwirkung nach der angezeigten niedrigsten Temperatur zu bemessen. Eine verlängerte Einwirkungszeit ist besonders bei niedrigen Temperaturen ohne erheblichen Einfluß auf das Ergebnis.

<sup>5</sup> A. HERZFELD: Zeitschr. Ver. f. Rübenzuckerind. 1890, 40, 203.



stören können, zu vermeiden, sind andere Vorschläge für die Ausführung der Inversion gemacht worden, die sich besonders für verdünntere Zuckerlösungen eignen:

$\beta\beta$ ) Inversion mit schwacher Salzsäure nach TH. v. FELLEBERG<sup>1</sup>. Man löst die Substanz in 50 ccm 0,02 N.-Salzsäure<sup>2</sup>, erhitzt 30 Minuten im siedenden Wasserbade, neutralisiert mit 0,1 N.-Lauge gegen Methylorange und füllt nach dem Abkühlen auf 100 ccm auf. — Da die Inversion auf einer Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration beruht, darf eine so schwach saure Lösung natürlich keine Pufferstoffe (z. B. Phosphate) enthalten, die durch Herabsetzung des Säuregrades die Inversion stark verlangsamten würden. Der gleiche Umstand ist bei der sog. „7 Minuteninversion“ von G. BRUHNS<sup>3</sup> zu beachten: Man erhitzt den Zucker (etwa 1 g)<sup>4</sup> nach Lösen in 20 ccm Wasser im Probierglase mit 0,20 ccm 6 N.-Salzsäure in stark siedendem Wasserbade während 7–8 Minuten. — Nach BRUHNS werden hierbei keine Reversionsstoffe erzeugt, sondern im Gegenteil die z. B. im Kunsthonig enthaltenen Aufbaudextrine wieder in Monosen zurückverwandelt.

$\gamma\gamma$ ) Inversion mit organischen Säuren. Diese Art der Inversion kommt vornehmlich in Frage, wenn die Zuckerlösung Pufferstoffe (Phosphate, Acetate usw.) enthält, weil die organischen Säuren in so großer Konzentration angewendet werden können, daß die Wirkung der Pufferstoffe auf den Säuregrad zurücktritt, ohne daß die entstehenden Monosen wesentlich geschädigt werden.

Man hat hierzu besonders Oxalsäure und Citronensäure verwendet. Letztere bietet nach J. PIERAERTS<sup>5</sup> noch den Vorteil, daß nur die Saccharose invertiert wird, während andere Biosen, wie z. B. Maltose unverändert bleiben sollen. So löst PIERAERTS zur Bestimmung von Saccharose neben Maltose 2,5 g des Zuckergemisches in Wasser und füllt auf 100 ccm auf. 25 ccm der Lösung werden mit Tonerdehydrat und 2 Tropfen Ammoniak geklärt, auf 50 ccm aufgefüllt und im 200 mm-Rohr polarisiert (Drehung a). 50 ccm der Lösung werden andererseits mit 10 ccm einer frisch bereiteten 20%igen Citronensäurelösung versetzt, schnell zum Kochen gebracht, 8 Minuten am Rückfluß im Sieden gehalten, dann sofort abgekühlt, mit Tonerdehydrat geklärt, auf 100 ccm aufgefüllt und wieder polarisiert (Drehung b). Aus der spezifischen Drehung der Saccharose von +66,5°, der Maltose von +130° und des Invertzuckers von –19,8° berechnet PIERAERTS dann die Menge der in 2,5 g des Zuckergemisches enthaltenen Saccharose ( $x$ ) und Maltose ( $y$ ) nach den Gleichungen

$$x = 0,5725(a-b) \quad y = 0,3846a - 0,2928(a-b).$$

Ob dieses Verfahren auch für die Bestimmung von Saccharose neben Lactose in Frage kommt, bedarf noch besonderer Prüfung.

Für die Inversion mit Oxalsäure, die das spezifische Drehungsvermögen nach GUBBE nicht beeinflussen soll, erhitzt W. MÖSLINGER<sup>6</sup> 75 ccm Wein mit 1,5 g kristallisierter Oxalsäure ( $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ ) 20 Minuten auf 70°. Nach W. FRESSENIUS und L. GRÜNHUT<sup>7</sup> werden unter diesen Bedingungen jedoch nur 97,0–98,9% der vorhandenen Saccharose invertiert.

$\delta\delta$ ) Inversion mit Enzymen. Die enzymatische Inversion der Saccharose mit Invertase ist besonders spezifisch. So wird Lactose durch das Enzym nicht gespalten, weshalb bereits BIGELOW und ELVOY<sup>8</sup> diese Methode zur Bestimmung von Saccharose und Lactose nebeneinander vorgeschlagen haben. Allerdings wird Raffinose ebenfalls in Fructose und Melibiose zerlegt.

C. S. HUDSON<sup>9</sup> gewinnen die Invertase dadurch, daß sie Preßhefe mit Chloroform versetzen, bei 20° über Nacht stehen lassen, filtrieren, das Filtrat mit Bleiacetat klären und

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1918, 9, 129.

<sup>2</sup> Entsprechend also 1 ccm N.-Salzsäure auf 50 ccm Lösung.

<sup>3</sup> G. BRUHNS: Chem.-Ztg. 1921, 45, 661, 681, 685, 711; C. 1921, IV, 820.

<sup>4</sup> Zur Darstellung von 1 g Invertzucker: 0,95 g Saccharose.

<sup>5</sup> J. PIERAERTS: Bull. Assoc. Chimistes Sucr. Dist. 1909, 26, 650; Z. 1910, 20, 93.

<sup>6</sup> W. MÖSLINGER: Chem.-Ztg. 1897, 21, 637; nach FRESSENIUS u. GRÜNHUT, vgl. Anm. 2.

<sup>7</sup> W. FRESSENIUS u. L. GRÜNHUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1920, 59, 422.

<sup>8</sup> BIGELOW u. ELVOY: Zeitschr. analyt. Chem. 1896, 35, 600.

<sup>9</sup> C. S. HUDSON: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1910, 47, 526; Z. 1911, 21, 244.

den Bleiüberschuß mit Kaliumoxalat ausfällen. Das Filtrat wird dann, mit Toluol konserviert, in einer Schweinsblase gegen fließendes Wasser dialysiert. Die Lösung hielt sich unter Toluol monatelang. Das Drehungsvermögen betrug nur etwa  $+1^{\circ}$  V im 400 mm-Rohr. Heute sind auch haltbare Lösungen des Enzyms von bestimmter Wirkungskraft im Handel<sup>1</sup>.

Löst man z. B. nach BRUHNS 0,9500 g Saccharose in 5–10 ccm Wasser in einem 100 ccm-Kölbchen, fügt einen kleinen Tropfen dieser Invertaseflüssigkeit hinzu und läßt bis zum folgenden Tage bei Zimmerwärme stehen, so ist die Umwandlung in Invertzucker beendet.

Die Inversionskonstante (vgl. S. 886) für die Inversion der Saccharose mit Invertase fand HUDSON<sup>2</sup> zu 141,7. Die Formel für den Prozentgehalt an Saccharose, durch Invertaseinversion bestimmt, lautet also:

$$Z = \frac{100 (P - I)}{141,7 - 05 t},$$

worin wieder  $P$  die direkte,  $I$  die Inversionspolarisation,  $t$  die Temperatur bedeuten.

H. S. PAINE und R. T. BALCH<sup>3</sup> beobachteten auch einen Einfluß der Konzentration auf die CLERGETSche Konstante, entsprechend der Gleichung

$$C = 131,17 + 0,073 c,$$

worin  $c$  die  $g$  Saccharose in 100 ccm bedeuten.

Für das Verhältnis der Drehung der Raffinose nach der Invertasehydrolyse zur ursprünglichen Drehung fanden sie die Zahl 0,521, die über einen großen Konzentrationsbereich ohne erhebliche Abweichungen gültig blieb.

Zur Ausführung der Saccharoseinversion löst HUDSON 26 g (Normalgewicht für den VENTZKE-Apparat) Substanz in Wasser, klärt in der üblichen Weise mit Bleiacetat, füllt auf 100 ccm auf und polarisiert im 200 mm-Rohr. Dann entfernt er den Bleiüberschuß mit Natriumcarbonat oder Kaliumoxalat, fügt zu 50 ccm des Filtrates tropfenweise Essigsäure bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus, gibt 5 ccm Invertaselösung und einige Tropfen Toluol hinzu, füllt auf 100 ccm auf und läßt bei 20–40° über Nacht stehen. Darauf stellt er auf 20° ein und liest die Drehung der Lösung im 400 mm-Rohr ab. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Drehung einige Minuten konstant bleibt (Multirotation der Fructose). Setzt man nach der Ablesung etwas Zucker hinzu und beobachtet einige Minuten, so kann man, wenn sich die Drehung allmählich ändert, annehmen, daß die Invertase aktiv war und die völlige Inversion vollzogen ist.

HUDSON fand auch an besonderen Versuchen, daß zwar die Raffinose durch Invertase hydrolysiert, dagegen Maltose, Lactose, Stärke, Dextrin, Cellulose, Pentosane, Amygdalin oder Salicin durch sie nicht angegriffen werden.

Die Invertase selbst wird nach C. S. HUDSON und H. S. PAINE<sup>4</sup> bei 65° Wärme schnell zerstört. Auch freies Alkali (über 0,01 n) und Mineralsäuren (bei über 0,05 N augenblicklich) wirken zersetzend auf Invertase.

### c) Anwendung der Inversion zur Saccharosebestimmung durch Reduktion.

Für die Saccharosebestimmung durch Reduktion mit Kupferlösung vor und nach Inversion, die bei verdünnteren Zuckerlösungen der polarimetrischen

<sup>1</sup> Sog. „Convertit“-Lösung von dem deutschen Vertreter der Numolin-Gesellschaft New York in Köln-Bayental zu beziehen. Ferner von E. Merck in Darmstadt.

<sup>2</sup> Vgl. Anm. 9 vorige Seite.

<sup>3</sup> H. S. PAINE and R. T. BALCH: Journ. Amer. Chem. Soc. 1927, **49**, 1019; **C.** 1927, **II**, 178. Vgl. auch Ind. Engin. chem. 1925, **17**, 240; **C.** 1925, **I**, 2416.

<sup>4</sup> C. S. HUDSON u. H. S. PAINE: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1910, **17**, 634; **Z.** 1911, **21**, 268.

Methode an Genauigkeit überlegen ist, eignet sich bei Abwesenheit von Pufferstoffen besonders die Inversion mit schwacher Salzsäure von TH. v. FELLEBERG (S. 888) oder BRUHNS (S. 888) oder mit Invertase (S. 888). Für die Zuckerbestimmung selbst wird die Arbeitsweise von SCHOORL mit FEHLINGScher (S. 866) oder LUFFScher Lösung (S. 871) hier auch deswegen vorzuziehen sein, weil sie für alle Zuckerarten die gleiche ist, wodurch gegebenenfalls nötig werdende Umrechnungen erleichtert werden.

Zur Umrechnung des gefundenen, bei der Inversion entstandenen Invertzuckers auf Saccharose dient der Faktor 0,950.

Außer durch Bestimmung des gesamten Invertzuckers kann man den Saccharosegehalt auch sehr genau aus der Menge der durch die Inversion gebildeten Glucose oder Fructose nach dem folgenden Abschnitt ableiten.

Da Melezitose (vgl. S. 860) direkt nicht, nach schwacher Inversion ebenfalls reduziert, kann sie Saccharose vortäuschen. Nach v. FELLEBERG<sup>1</sup> entspricht das Reduktionsvermögen der Melezitose nach schwacher Inversion 68,8% des der Saccharose. Ähnliches gilt nach dem gleichen Forscher vom Honigdextrin (vgl. S. 909), dessen Reduktionswert direkt 0,38, nach schwacher Inversion 30,9% des betreffenden Reduktionswertes der Saccharose entspricht.

## 2. Bestimmung der Maltose.

Wenn als Zucker in einer Lösung nur Maltose vorhanden ist, kann diese mit FEHLINGScher (S. 863) oder LUFFScher Lösung (S. 871), jodometrisch nach folgendem Abschnitt oder auch polarimetrisch (S. 875) bestimmt werden.

## 3. Bestimmung der Lactose.

Wenn in einer Lösung außer Lactose kein anderer Zucker vorkommt, wie z. B. in Milch und ungezuckerten Milcherzeugnissen, kann die Lactosebestimmung in der nach S. 881 mit Kaliumferrocyanid und Zinkacetat geklärten Lösung durch Polarisation nach S. 875, oder mit FEHLINGScher Lösung nach S. 861 oder auch jodometrisch nach folgendem Abschnitt erfolgen. — Bei der Polarisation pflegt man das Volumen des Unlöslichen, einschließlich Klärmittel für 75 ccm Vollmilch mit 6, für 75 ccm Magermilch mit 3 ccm, in Rechnung zu setzen.

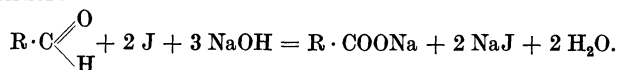
Über die jodometrische Bestimmung der Lactose in Milch und Milcherzeugnissen vgl. auch P. A. KOMETIANI<sup>2</sup>.

## F. Bestimmung der Zucker nebeneinander.

### 1. Glucose und Fructose.

#### a) Bestimmung der Glucose (Aldose) mit alkalischer Jodlösung.

Die Oxydation von Aldosen durch Jod in schwach alkalischer Lösung in der Kälte unterscheidet sich von der Reduktion durch alkalische Kupferlösung in der Hitze wesentlich dadurch, daß in ersterem Falle das Zuckermolekül nur zu der betreffenden Säure mit gleich langer Kohlenwasserstoffkette oxydiert wird, nicht aber in niedrigere molekulare Bruchstücke zerfällt. Der Vorgang ist also folgender:



So erklärt es sich auch, daß Ketosen mit der Gruppe — CO — oder intramolekulargebundene Aldehydgruppen wie bei der Saccharose mit Jod nicht

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1933, 24, 376.

<sup>2</sup> P. A. KOMETIANI: Z. 1932, 63, 194.

reagieren können, wenn durch geeignete Versuchsbedingungen Nebenreaktionen ausgeschlossen werden.

Die genannte Oxydierbarkeit der Aldosen gegenüber Ketosen durch Jod in schwach alkalischer Lösung (Hypoiodid) wurde zuerst von G. ROMIJN<sup>1</sup> zu ihrer Bestimmung verwendet, und zwar in Boraxlösung. R. WILLSTÄTTER und G. SCHUDEL<sup>2</sup> vereinfachten die Methode durch Anwendung eines Gemisches von Jodlösung und Natronlauge, während J. BOUGAULT<sup>3</sup> die Oxydation in Natriumcarbonatlösung vorschlug. I. M. KOLTHOFF<sup>4</sup> hat die beiden letztgenannten Vorschläge nachgeprüft und als optimale Versuchsbedingungen folgende gefunden:

α) Jod-Natronlauge-Verfahren. Zu 10 ccm der Zuckerlösung, die höchstens 1,1% Glykose enthalten darf, setzt man 25 ccm 0,1 N.-Jodlösung und darauf unter Umschütteln 30 ccm 0,1 N.-Lauge. Nach 3–10 Minuten langem Stehen im verschlossenen Gefäß säuert man mit verdünnter Schwefel- oder Salzsäure an und titriert den Jodüberschuß mit Thiosulfatlösung zurück. Je 1 ccm verbrauchter 0,1 N.-Jodlösung entspricht 9,00 mg Glykose.

β) Jod-Natriumcarbonat-Verfahren. Zu 10 ccm der 0,9–1,2%igen Zuckerlösung setzt man 25 ccm 0,1 N.-Jodlösung und 15 ccm N.-Natriumcarbonatlösung und titriert nach 20–25 Minuten unter Ansäuern mit 10 ccm 4 N.-Salz- oder Schwefelsäure den Jodüberschuß mit Thiosulfatlösung zurück. Je 1 ccm verbrauchte 0,1 N.-Jodlösung entspricht 9,00 mg Glucose. Von Bedeutung ist auch die Reihenfolge der Zusätze, also zuerst die Jodlösung, dann das Alkali<sup>5</sup>.

Über das Verhalten von Begleitstoffen der Aldosen gegenüber Jodlösung unter vorstehenden Bedingungen fand KOLTHOFF:

Tabelle 13.

| Art und Menge (g) des Zusatzes           | Verbrauch an Jodlösung, berechnet auf je 1 g Zusatz. |   |  |   |
|--|--|---|--|---|
|  | in 0,1 N.-Jodlösung                                  |   | in Prozent scheinbarer Glucose des zugesetzten Stoffes |   |
|  | NaOH-Verfahren<br>ccm                                | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Verfahren<br>ccm | NaOH-Verfahren<br>%                                    | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Verfahren<br>% |
| 0,5 Saccharose . . . . .                 | 0,60   | 0,32  | 0,54   | 0,29  |
| 1 Saccharose . . . . .                   | 0,50   | 0,30  | 0,45   | 0,27  |
| 2 Saccharose . . . . .                   | 0,35   | 0,32  | 0,32   | 0,29  |
| 3 Saccharose . . . . .                   | —  | 0,30  | —  | 0,27  |
| 4 Saccharose . . . . .                   | 0,35   | —   | 0,32   | —   |
| 0,1 Fructose . . . . .                   | 1,2  | 1,0   | 1,18   | 0,9   |
| 0,5 Fructose . . . . .                   | 1,2  | 1,0   | 1,18   | 0,9   |
| 0,1 Dextrin (Kahlbaum) . . . . .         | 12   | 12  | 11   | 11  |
| 0,2 Dextrin (Kahlbaum) . . . . .         | 12   | 12  | 11   | 11  |
| 1 Mannit . . . . .                       | 0,8  | 0,9   | 1,0  | 0,8   |
| 1 Glycerin (Arzneibuchware) . . . . .    | 0,15   | 0,7   | 1,7  | 0,6   |
| 1 Natriumformiat . . . . .               | 1,0  | 1,0   | 0,18   | 0,9   |
| 0,25 Natriumlactat, wasserfrei . . . . . | —  | 1,0   | —  | 0,9   |
| 1 Harnstoff . . . . .                    | 0,08   | —   | 0,07   | —   |

Das Natriumcarbonatverfahren liefert hiernach die geringsten und gleichmäßigsten Abweichungen, die sich durch blinden Versuch mit dem anderen

<sup>1</sup> G. ROMIJN: Zeitschr. analyt. Chem. 1897, **36**, 349.

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. G. SCHUDEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1918, **51**, 780; C. 1918, II, 406.

<sup>3</sup> J. BOUGAULT: Journ. Pharm. et Chim. 1917, **16**, 97 u. 313, nach KOLTHOFF.

<sup>4</sup> I. M. KOLTHOFF: Z. 1923, **45**, 131 u. 141.

<sup>5</sup> Vgl. G. M. KLINE u. S. F. ACREE: Journ. engin. Chem., Analyt. Edition 1930, **2**, 413; C. 1930, II, 3820.

Stoffe feststellen lassen. So bestimmt KOLTHOFF unter denselben Umständen, nach denen der Versuch selbst vorgenommen wird, die Menge Jod, die durch die anderen Stoffe gebunden wird. — Die an sich kleine Störung durch Fructose beruht nach R. E. LOTHROP und R. L. HOLMES<sup>1</sup> vorwiegend auf Umlagerung in Mannose und Glucose nach LOBRY DE BRUYN.

Bei der Titration von Glucose in Invertzucker kann man auch von dem Ergebnis 1% des gefundenen Wertes als Korrektur für den Einfluß der Fructose in Abzug bringen.

Zu beachten ist ferner, daß auch andere Aldosen, wie Galaktose, Arabinose, Rhamnose, Lactose und Maltose mit je einer Aldehydgruppe analog wie Glucose reagieren und entsprechend ihrem Molekulargewicht in Rechnung zu setzen sind.

Die jodometrische Aldosenbestimmung auf vorstehende Weise ist von verschiedenen Forschern nachgeprüft und als brauchbar befunden worden. So bewährte sich das Jod-Natronlauge-Verfahren nach WILSTÄTTER und SCHUDEL nach A. BEHRE<sup>2</sup> bei Honig und Kunsthonig. F. AUERBACH und G. BORRIES<sup>3</sup> geben eine besondere Arbeitsvorschrift an, die aber nach K. D. DEKKER<sup>4</sup> noch zu Fehlern führte. DEKKER verwendete eine Pufferlösung aus Carbonat-Bicarbonat. D. T. ENGLIS und W. J. BYER<sup>5</sup> arbeiteten wieder in einer Carbonat-Borat-Pufferlösung bei  $p_H = 10,6$  und fanden, daß die Oxydation der Glucose mit der dreifachen theoretischen Jodmenge in 20 Minuten bei 26—27° stöchiometrisch, auch in Gegenwart der vierfachen Menge Fructose, verläuft. C. S. SLATER und S. F. ACREE<sup>6</sup> fanden daher, daß man statt des Jodüberschusses auch den Alkaliüberschuß bzw. Alkaliverbrauch bei der Bildung des Natriumsalzes acidimetrisch messen kann.

#### b) Bestimmung der Fructose nach Oxydation der Aldosen mit alkalischer Jodlösung.

Das vorstehend beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Aldosen bietet auch die Möglichkeit, umgekehrt die Aldosen quantitativ zu oxydieren und dann die nicht veränderte Fructose durch Kochen mit alkalischer Kupferlösung zu bestimmen, wenn man den Jodüberschuß auf geeignete Weise vorher beseitigt. I. M. KOLTHOFF<sup>7</sup> erreichte dieses durch schweflige Säure nach folgenden einfachen Vorschriften: Zu einer passenden Menge der Flüssigkeit setzt man eine zur Oxydation der Glucose genügende Menge Jodlösung und Natronlauge. Nach 5 Minuten langem Stehen säuert man eben mit Salzsäure an und nimmt den Jodüberschuß zunächst mit einer 10%igen und, wenn die Flüssigkeit schwach gelb geworden ist, mit einer 1%igen Natriumsulfidlösung genau fort und neutralisiert gegen Methylorange. Darauf füllt man auf 100 ccm auf und bestimmt in 25 ccm der Flüssigkeit die Fructose nach der Vorschrift von SCHOORL (S. 866).

Zur Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose nebeneinander verfährt KOLTHOFF, wie folgt: Zunächst wird die Glucose jodometrisch bestimmt. Die Summe von Glykose und Fructose bestimmt man mit alkalischer Kupferlösung — oder man bestimmt in einer besonderen Probe die Fructose, wie vorhin beschrieben ist. Für je 100 mg Fructose neben Glucose bringt man 0,1 ccm 0,1 N.-Jodlösung von dem bei Glucose gefundenen Werte in Abzug. Die Saccharose wird bestimmt, indem man eine Lösung des Stoffes in 50 ccm 0,02 N.-Salzsäure  $\frac{1}{2}$  Stunde in kochendem Wasserbade nach v. FELLEBERG (S. 888) invertiert, darauf mit 0,1 N.-Lauge gegen Methylorange neutralisiert

<sup>1</sup> R. E. LOTHROP u. R. L. HOLMES: Journ. engin. Chem. Analyt. Edition 1931, **3**, 334.

<sup>2</sup> A. BEHRE: Z. 1921, **41**, 226.

<sup>3</sup> F. AUERBACH u. G. BORRIES: Arb. Reichsgesundh.-Amt 1926, **57**, 318; Z. 1927, **54**, 318.

<sup>4</sup> K. D. DEKKER: Arch. Suikerind. Nederl.-Indie 1928, 699; C. 1929, **I**, 312.

<sup>5</sup> D. T. ENGLIS u. W. J. BYER: Ind. Engin. chem., Analyt. Edition 1930, **2**, 121.

<sup>6</sup> C. S. SLATER u. S. F. ACREE: Ind. Engin. chem., Analyt. Edition 1930, **2**, 274; C. 1930, **I**, 1892.

<sup>7</sup> J. M. KOLTHOFF: Z. 1923, **45**, 131 u. 141.

und nach dem Abkühlen auf ein bestimmtes Volumen auffüllt. Nun bestimmt man den Glucosegehalt von neuem (korrigiert wieder für die Fructose) und berechnet aus dem Unterschiede vor und nach der Inversion durch Malnehmung des Unterschiedes in den Titrationswerten in Kubikzentimetern mit 17,1 den Saccharosegehalt in Milligramm.

Dieses Verfahren von KOLTHOFF bewährte sich nach R. T. A. MEES<sup>1</sup> bei der Untersuchung von Honigkuchen. MEES verwendet aber zur Oxydation der Glucose eine stärkere Jodlösung als KOLTHOFF, nämlich normale Jodlösung und vermeidet dadurch eine zu starke Verdünnung der Zuckerlösung. Das Verfahren von KOLTHOFF bildet ferner die Grundlage der Arbeitsweise von C. J. KRUISHEER zur Analyse von Zuckergemischen, die weiter unten (S. 895) ausführlicher beschrieben werden soll.

Da indes Melezitose ebenso wie Saccharose erst nach schwacher Inversion Jodlösung und Kupferlösung reduziert, kann sie nach v. FELLEBERG Saccharose, und zwar 68,8% ihrer eigenen Menge vortäuschen, was besonders bei Honig und honighaltigen Lebensmitteln zu beachten ist. Ähnliches gilt vom Honigdextrin, vgl. S. 890.

### e) Polarimetrische Bestimmungen von Glucose und Fructose nebeneinander.

#### α) Berechnung aus dem Gesamtzucker und dessen Drehung.

Wenn nur Fructose und Glucose nebeneinander in einer Lösung vorhanden sind, kann die Ermittlung beider aus der spezifischen Drehung erfolgen, wenn der Gesamt-Zuckergehalt  $p$  und das Drehungsvermögen  $\alpha$  bekannt sind. Nach J. HETPER<sup>2</sup> verfährt man, wie folgt:

Bezeichnet

- $s_1$  die 1<sup>o</sup> entsprechende Gewichtsmenge der Zuckerart  $a_1$ ,
- $s_2$  die der Zuckerart  $a_2$ ,
- $r_1$  das Drehungsvermögen der Zuckerart  $a_1$  in 100 ccm Lösung,
- $r_2$  das der Zuckerart  $a_2$ ,

so ist

$$p = r_1 s_1 + r_2 s_2.$$

Da nun  $r_2 = \alpha - r_1$  ist, so folgt:

$$p = r_1 s_1 + \alpha s_2 - r_1 s_2 \quad r_1 = \frac{p - \alpha s_2}{s_1 - s_2}.$$

Da ferner  $a_1 = r_1 s_1$  ist, so ergibt sich

$$a_1 = \frac{s_1}{s_1 - s_2} (p - \alpha s_2) \quad \text{oder} \quad a_1 = \frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2} \left( p \frac{1}{s_2} - \alpha \right),$$

$\frac{1}{s_2}$  ist die 1 g entsprechende Drehungskonstante. Die letzte Gleichung in Worten lautet also:

Der Gehalt ( $a_1$ ) an einer von zwei Zuckerarten in einer  $p$ -%igen Lösung beider zusammen ist gleich der Differenz des Drehungsvermögens einer  $p$ -%igen Lösung der anderen Zuckerart und der Drehung der gegebenen Lösung, multipliziert mit  $\frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2}$ .

Beispiel. Eine Honiglösung mit 21,5 g Zucker in 100 ccm polarisiert nach der Inversion  $-4,89^\circ$  (Kreisgrade) ( $\alpha = -4,89$ ).

Das Drehungsvermögen<sup>2</sup> einer 21,5%igen Glucoselösung ist für  $p = 10$  21,5mal 1,054 = 22,66<sup>o</sup>.

Das Drehungsvermögen<sup>3</sup> einer 21,5%igen Fructoselösung ist für  $t = 20^\circ$   $l = 10$ : 21,5mal 1,876 = + 40,33<sup>o</sup>.

Hieraus folgt:

$$\text{Glucose} = \frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2} (40,33 - 4,89),$$

$$\text{Fructose} = \frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2} (22,66 + 4,89).$$

<sup>1</sup> R. T. A. MEES: Chem. Weekbl. 1928, 25, 674.

<sup>2</sup> J. HETPER: Z. 1910, 19, 640.

<sup>3</sup> Vgl. S. 878. Der Einfluß der Konzentration ist  $= \frac{p}{2}$  zu setzen, da der Wert  $\frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2}$  für gleichen Gehalt an beiden Zuckerarten in der Lösung berechnet wurde.

Für die Ableseung der Zahlenwerte des Koeffizienten  $\frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2}$  gibt HETPER folgende Tafel<sup>1</sup> an:

Der Wert des Koeffizienten  $\frac{s_1 s_2}{s_1 - s_2}$  in Kreisgraden bei Anwendung eines 200 mm-Rohres zur

| Konzentration der Lösung % | Berechnung der Glucose und Fructose bei der Temperatur |        |        |        |        |        |        |        |        |        | Berechnung der Glucose und des Dextrins |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
|                            | 13°  | 14°    | 15°    | 16°    | 17°    | 18°    | 19°    | 20°    | 21°    | 22°    |   |
| 10 ( 5 + 5)                | 0,3326   | 0,3341 | 0,3355 | 0,3370 | 0,3384 | 0,3399 | 0,3414 | 0,3429 | 0,3444 | 0,3459 | 0,3516                                  |
| 20 (10 + 10)               | 0,3311   | 0,3325 | 0,3339 | 0,3354 | 0,3368 | 0,3383 | 0,3397 | 0,3412 | 0,3427 | 0,3443 | 0,3520                                  |
| 30 (15 + 15)               | 0,3295   | 0,3309 | 0,3323 | 0,3337 | 0,3351 | 0,3366 | 0,3380 | 0,3395 | 0,3410 | 0,3425 | 0,3524                                  |

Wir setzen entsprechend  $p = 20$ ,  $t = 20$  ein und erhalten:

$$\text{Glucose} = 0,3412 (40,33 - 4,89) = 12,09 \text{ g}$$

$$\text{Fructose} = 0,3412 (22,66 + 4,89) = 9,40 \text{ g}$$

$$\text{Summe } 21,49 \text{ g in } 100 \text{ ccm.}$$

### β) Bestimmung von Glucose und Fructose durch ihr Verhalten gegen Natriumbisulfit.

Das verschiedene Verhalten von Glucose und Fructose bei der Polarisation gegen Natriumbisulfit (S. 879) verwenden Y. TOMODA und T. TAGUCHI<sup>2</sup> auch zu ihrer Bestimmung nebeneinander. Da die Drehung der Fructose nur wenig beeinflusst wird, dagegen die der Glucose fast 0 wird, liegen gerade für diese beiden Zuckerarten die Bedingungen am günstigsten.

Verschiedene Glucosekonzentrationen lieferten bei Gegenwart von 30 g Natriumbisulfit in 100 ccm folgende kleinen Drehungen:

|                                     |      |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| g Glucose in 100 ccm                | 1    | 3     | 8     | 10    | 15    | 20    | 25    |
| Drehung ( VENTZKE-Grade:            | 0,0  | -0,3  | -0,5  | -0,5  | -0,2  | +0,1  | +0,8  |
| bei 20° ( Kreisgrade <sup>3</sup> : | 0,00 | -0,10 | -0,17 | -0,17 | +0,07 | +0,03 | +0,28 |

Ist nun in einer Lösung  $x$  die gesuchte Glucose (g in 100 ccm),  $y$  die gesuchte Fructose (g in 100 ccm),  $P$  die Ablesung vor,  $P'$  die nach Zusatz von Bisulfit, so ist

$$x = 0,3225 (P - P')$$

$$y = 0,1859 (-P')$$

wenn  $P$  und  $P'$  in VENTZKE-Graden ausgedrückt sind,

$$x = 0,930 (P - P')$$

$$y = 0,536 (-P')$$

bei Umrechnung von  $P$  und  $P'$  in Kreisgrade.

Das Verfahren wird von TOMODA und TAGUCHI besonders für Honig empfohlen.

Sind neben Glucose und Fructose noch weitere Zuckerarten vorhanden, so sind die polarimetrischen Verfahren nicht ohne weiteres anwendbar. Nur Saccharose stört insofern nicht, als sie leicht durch Inversion nach S. 886 in Glucose und Fructose umgewandelt werden kann.

### γ) Bestimmung der Fructose und Glucose durch Erhitzen mit Salzsäure.

Wie zuerst E. SIEBEN<sup>4</sup> festgestellt hat, wird beim Erhitzen mit starker Salzsäure die Fructose zerstört, während Glucose in der Hauptsache erhalten bleibt. Doch bilden sich, wie E. LUCIUS<sup>5</sup> fand, dabei beträchtliche Mengen löslicher Huminstoffe von erheblicher Reduktionskraft. Nach LUCIUS ist es daher zweckmäßig, die zurückbleibende Glucose nicht durch Reduktion, sondern polarimetrisch zu ermitteln.

<sup>1</sup> Auch für Glucose neben Dextrin.

<sup>2</sup> Y. TOMODA and T. TAGUCHI: Journ. Soc. chem. Ind. Japan 1930, **33**, 434.

<sup>3</sup> Eigene Umrechnung.

<sup>4</sup> E. SIEBEN: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1884, **34**, 868; nach LUCIUS.

<sup>5</sup> E. LUCIUS: Z. 1919, **38**, 177; 1923, **45**, 94.

Nach LUCIUS ist folgende Versuchsanordnung zu empfehlen:

50 ccm der Zuckerlösung werden in einem 200 ccm-Meßkölbchen mit 20 ccm 5 N.-Salzsäure vermischt und 3 Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Salzsäure mit 5 N.-Natronlauge, bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft und bei 20° auf 100 ccm aufgefüllt. Die abgeschiedenen Huminstoffe werden abfiltriert, das bräunlichgelbe Filtrat mit wenig Tierkohle in der Kälte behandelt<sup>1</sup> und bei 20° im 200 m-Rohr polarisiert.

Bei der Polarisation vor der Säurebehandlung ist die Mutarotation zu berücksichtigen. Die Glucose berechnet sich aus dem nach der Säureeinwirkung gebliebenen Drehungswinkel, die Fructose aus der Differenz der Drehungswinkel vor und nach der Zerstörung.

1° Rechtsdrehung = 0,95 g Glucose,

1° Linksdrehung = 0,54 g Fructose.

Bei dem Verfahren fand LUCIUS von zugesetzten Fructosemengen 96,1—101,0%, von Glucosemengen 95,0—96,7% zurück.

### e) Colorimetrische Bestimmung der Fructose mit Schwefelsäure.

Noch einfacher bestimmen H. RIFFART und C. PYRIKI<sup>3</sup> den Gehalt einer Zuckerlösung an Fructose bzw. Saccharose durch Erwärmen von 1 Raumteil der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 2 Raumteilen 70%iger Schwefelsäure auf 55° während 10 Minuten, worauf dann die entstehende Braunfärbung colorimetrisch gemessen wird. Das Verfahren, auf dessen Einzelheiten verwiesen sei, kann natürlich nur ungefähre Werte liefern, hat aber den Vorzug, rasch ausführbar zu sein.

Ähnliches gilt von einem Vorschlage von J. FIEHE<sup>1</sup>, das unter bestimmten Bedingungen mit heißer Salzsäure aus Fructose oder Saccharose gebildete Oxymethylfurfurol als Phloroglucid abzuscheiden und zu wägen.

## 2. Glucose, Fructose, Saccharose, Dextrin und Fructosane nach C. J. KRUISHEER<sup>4</sup>.

Bei den meisten Lebensmitteln bestehen die in Wasser löslichen Kohlenhydrate zum weitaus größten Teile oder ausschließlich aus Saccharose, Glucose, Fructose oder den Kondensationsprodukten letzterer wie Maltose und Dextrin einerseits, Fructosan andererseits. Hieraus erhellt, daß die genaue Analyse eines solchen Gemisches allgemein von größter Bedeutung sein muß. C. J. KRUISHEER<sup>1</sup> benutzt hierzu einerseits das in seinen Grundzügen von KOLTHOFF zuerst vorgeschlagene Verfahren zur Fructosebestimmung (S. 892), andererseits die „schwache“ oder „starke“ Inversion mit 3%iger Salzsäure, durch Erwärmen von 10 Minuten bei 68—70° bzw. 60 Minuten im siedenden Wasserbade.

### a) Bestimmung von Saccharose, Invertzucker und Stärkesirup bzw. Stärkezucker nebeneinander.

Bestimmt man nun direkt bzw. nach schwacher oder starker Inversion in den entstandenen Zuckerlösungen das Reduktionsvermögen und den Fructosegehalt, so hat man alle Grundlagen zur Berechnung der Zusammensetzung des Kohlenhydratgemisches nach folgender Übersicht:

| Ohne Inversion                      |          | Nach schwacher Inversion<br>(10 Minuten bei 68—70°) |          | Nach starker Inversion<br>(60 Minuten bei 100°) |          |
|-------------------------------------|----------|---|----------|---|----------|
| Reduktions-<br>vermögen<br>(Zucker) | Fructose | Reduktions-<br>vermögen                             | Fructose | Reduktions-<br>vermögen                         | Fructose |
| $R_1$                               | $F_1$    | $R_2$   | $F_2$    | $R_3$   | $F_3$    |

<sup>1</sup> Bei konz. Zuckerlösungen bleibt eine hellgelblich-bräunliche Färbung, die aber die Polarisation nicht beeinträchtigt.

<sup>2</sup> H. RIFFART u. C. PYRIKI: *Z.* 1924, 48, 197.

<sup>3</sup> J. FIEHE: *Z.* 1932, 63, 288.

<sup>4</sup> C. J. KRUISHEER: *Z.* 1929, 58, 261.



a) Das Reduktionsvermögen  $R_1$  wird in einer passenden Menge der Lösung nach LUFF-SCHOORL (S. 871) bestimmt und das Ergebnis auf Prozente der ursprünglichen Substanz umgerechnet.

b) Zur Fructosebestimmung vor der Inversion  $F_1$  wird eine Substanzmenge, die höchstens 3,5 g Extrakt enthält, in einem 100 ccm-Meßkolben<sup>1</sup> gelöst und nötigenfalls filtriert (Grundlösung).

Vermutet man die Anwesenheit von Stärkezucker (Blockzucker, Kistenzucker), von reiner Glucose (ausgenommen als Bestandteil des Invertzuckers) oder von anderen stärkerreduzierenden Stoffen, so löst man nur die Hälfte der oben genannten Menge auf<sup>2</sup>.

Von dieser Lösung pipettiert man 25 ccm in einen 100 ccm-Meßkolben, versetzt mit 25 ccm Wasser<sup>3</sup> und macht mit 5 ccm 4 N.-Natronlauge alkalisch. Gleich darauf läßt man 16 ccm Jodlösung (hergestellt durch Lösen von 13 g Jod und 15 g Kaliumjodid zu 100 ccm) oder soviel mehr dieser Jodlösung, als erforderlich ist, um eine bleibende braune Farbe des Jods zu erhalten, schnell zufließen. Nach 5–7 Minuten langem Stehen fügt man 3 ccm 4 N.-Schwefelsäure hinzu; darauf nimmt man das übrig gebliebene Jod mit Natriumsulfitlösung (20 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  zu 100 ccm) fort, bis die Flüssigkeit noch eben gefärbt ist (gewöhnlich sind hierfür 6–10 ccm erforderlich). Dann nimmt man die letzte Jodmenge nach Hinzufügen von 4–5 Tropfen 2%iger Stärkelösung fort, erst mit einer 20%igen und schließlich mit einer 2%igen Natriumsulfitlösung. Ist etwa ein wenig zuviel Natriumsulfit hinzugefügt, so kann dieses mit N.-Jodlösung und schließlich mit 0,1 N.-Jodlösung fortgenommen werden. Diese Entfärbung muß die Schärfe einer Titration haben<sup>4</sup>, was sehr leicht geht. Darauf versetzt man mit einigen Tropfen Methylorangefärbung und neutralisiert die Lösung beinahe — bis ganz schwach sauer — mit 4 N.-Natronlauge (etwa 2 ccm), kühlt die Lösung ab und füllt bis zur Marke auf. In einer passenden Menge dieser Flüssigkeit bestimmt man das Reduktionsvermögen nach LUFF-SCHOORL (S. 871) oder nach LEHMANN-SCHOORL (S. 866). Das Ergebnis drückt man in Prozenten Fructose für die ursprüngliche Substanz aus.

Bemerkungen: Da nach dem Zusatz aller Reagenzien das Volumen 100 ccm nicht überschreiten soll, vermeide man überflüssige Zusätze. Aus diesem Grunde soll das Entfärben des Jods praktisch gänzlich mit 20%iger Sulfitlösung stattfinden, weil die 2%ige Lösung zu viel Raum erfordert. Bei einiger Übung kann man die 2%ige Sulfitlösung auch entbehren, indem man mit 20%iger Sulfitlösung entfärbt (höchstens ein Tropfen zu viel) und mit 0,1 N.-Jodlösung zurücktitriert.

Um die angegebenen Mengen Natronlauge, Jod und Schwefelsäure mit der erforderlichen Genauigkeit abmessen zu können, sind Meßzylinder nicht geeignet; man verwende hierzu Meßpipetten mit Dezimalteilung.

Die Sulfitlösungen sollen frisch bereitet werden; die 20%ige Lösung ist einige Tage haltbar; der Gehalt der 2%igen Lösung ist schon nach einem Tage stark zurückgegangen.

Ein Niederschlag (Jodoform usw.), der bisweilen während der Ausführung entsteht, braucht nicht abfiltriert zu werden, weil er auf das Reduktionsvermögen keinen merklichen Einfluß hat.

c) Zur Bestimmung des Reduktionsvermögens nach schwacher Inversion ( $R_2$ ) werden 50 ccm der Grundlösung (vgl. unter b) in einem

<sup>1</sup> Basisch oder sauer reagierende Stoffe werden vorher mit Salzsäure bzw. Natronlauge neutralisiert. Von weniger homogenen Stoffen wird eine größere Menge zu einem entsprechend größeren Volumen gelöst.

<sup>2</sup> Weil der Hypojodidverbrauch sonst nicht ausreichen würde.

<sup>3</sup> Es ist natürlich zulässig, von einer stärkeren oder verdünnteren Grundlösung weniger oder mehr abzupipettieren und soviel Wasser hinzuzufügen, daß das Gesamtvolumen 50 ccm wird. Man beachte dabei jedoch, daß die angegebenen Mengen Jod und Lauge nur die völlige Oxydation von 0,9 g Extrakt (oder bei möglicher Anwesenheit von Stärke- zucker usw. von 0,45 g Extrakt) verbürgen.

<sup>4</sup> Vor dem Ende dieser Bearbeitung spritzt man mit wenig Wasser die Wand des Kolbens ab, weil diese gewöhnlich mit starker Sulfitlösung benetzt ist.

100 ccm-Maßkolben pipettiert, mit 5 ccm 30%iger (= 9,5-normal) Salzsäure versetzt und während 10 Minuten bei 68–70° invertiert. Nach Abkühlung wird genau gegen Methylorange neutralisiert, abermals gekühlt und zur Marke aufgefüllt. In einer passenden Menge wird das Reduktionsvermögen nach LUFF-SCHOORL bestimmt und das Ergebnis auf Prozente der ursprünglichen Substanz berechnet.

d) Fructosebestimmung nach schwacher Inversion ( $F_2$ ): 50 ccm der unter c erhaltenen invertierten und bis 100 ccm aufgefüllten Lösung pipettiert man in einen 100 ccm-Maßkolben, versetzt mit 5 ccm 4 N.-Natronlauge und verfährt weiter in der unter b angegebenen Weise (16 ccm Jodlösung usw.). Darauf bestimmt man das Reduktionsvermögen und berechnet das Ergebnis auf Prozente Fructose in der ursprünglichen Substanz.

e) Reduktionsvermögen nach starker Inversion ( $R_3$ ): 25 ccm<sup>1</sup> der „Grundlösung“ (s. unter b) werden in einen 100 ccm-Maßkolben pipettiert, mit genau 25 ccm Wasser und 5 ccm 30%iger (= 9,5-normal) Salzsäure versetzt und während genau 1 Stunde unter Eintauchen in ein bei 100° siedendes Wasserbad erhitzt. Hierbei ist die Zeit sofort von dem Einbringen in das Bad, das zuvor zum Sieden erhitzt ist, zu berechnen. Die Erhitzung des Bades soll so kräftig sein, daß innerhalb 5 Minuten nach dem Einbringen des Kölbchens in das Wasserbad das Wasser wieder kocht. Nach schnellem Abkühlen wird genau neutralisiert. Das Neutralisieren auf Methylorange liefert wegen der Dunkel-färbung der Flüssigkeit öfters Schwierigkeiten; in diesem Falle versetzt man mit 11,9 ccm 4 N.-Natronlauge, welche mit 5 ccm 30%iger Salzsäure äquivalent sind. Nach abermaliger Kühlung füllt man bis zur Marke auf; Abfiltrieren eines etwaigen Niederschlages ist überflüssig. In einer passenden Menge — gewöhnlich 25 ccm einer abermaligen Verdünnung von 25 ccm zu 100 ccm — bestimmt man das Reduktionsvermögen nach LUFF-SCHOORL, und zwar nach der von SCHOORL S. 872 angegebenen Ausführungsweise (Cupribestimmung durch Zurücktitration nach der Rhodanmethode von BRUHNS), welche in diesem Falle die genauesten Ergebnisse liefert. Die Methode LEHMANN-SCHOORL ist für die Bestimmung von  $R_3$  nicht brauchbar.

Das Ergebnis wird auf Prozente der ursprünglichen Substanz umgerechnet.

Bemerkungen: Will man die Gleichung VIIIb anwenden, in welchem Falle die Bestimmung von  $F_3$  überflüssig wird, da  $F_3$  immer mit guter Annäherung = 0,55  $F_2$  ist, so muß die starke Inversion auch ganz genau in der vorgeschriebenen Weise ausgeführt werden, weil es von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie weit die Zerstörung der Fructose fortschreitet. So muß die zu invertierende Flüssigkeitsmenge genau = 55 ccm sein und die Stärke der verwendeten Salzsäure (9,5-normal) ist zu prüfen.

f) Fructosebestimmung nach starker Inversion ( $F_3$ ): 50 ccm der unter e erhaltenen, invertierten und zu 100 ccm aufgefüllten Lösung pipettiert man in einen 100 ccm-Maßkolben. Man versetzt mit 5 ccm 4 N.-Natronlauge und verfährt weiter in der unter b angegebenen Weise (16 ccm Jodlösung, usw.). Darauf bestimmt man das Reduktionsvermögen und berechnet das Ergebnis auf Prozente Fructose der ursprünglichen Substanz.

Nun ist zu beachten, daß bei der schwachen Inversion aus Saccharose, wenn zunächst die Anwesenheit von anderen selteneren fructosehaltigen Zuckerarten (Raffinose, Melbiose, Inulin, Fructosan) nicht berücksichtigt wird, die Saccharose 52,63% Fructose liefert, also

$$1 \text{ Fructose} = \frac{100}{52,63} = 1,900 \text{ Saccharose entspricht.}$$

<sup>1</sup> Wenn man anlässlich der möglichen Anwesenheit von Stärkezucker oder dgl. eine verdünntere „Grundlösung“ bereitet hat, so können in diesem Falle 50 ccm in Bearbeitung genommen werden, weil eine stärkere Verdünnung für  $F_3$  hier doch schon stattfindet.

Nennt man nun

|  |   |
|--|---|
| $G_1$ = Glucose vor der Inversion.             | $S_1$ = Saccharose vor der Inversion.                           |
| $G_2$ = Glucose nach schwacher Inversion.      | $S_x$ = Saccharose + Invertzucker (umgerechnet auf Saccharose). |
| $G_3$ = Glucose nach starker Inversion.        | $Z$ = wasserfreien Stärkesirup oder Stärkezucker.               |
| $I_1$ = Invertzucker vor Inversion.            | $D$ = Dextringehalt (vgl. unten).                               |
| $I_2$ = Invertzucker nach schwacher Inversion. |   |

so berechnet KRUISHEER folgende Beziehungen:

$$\begin{array}{ll} G_1 = R_1 - F_1 & \text{(I)} \\ G_2 = R_2 - F_2 & \text{(II)} \\ G_3 = R_3 - F_3 & \text{(III)} \\ I_1 = 2 F_1 & \text{(IV)} \\ I_2 = 2 F_2 & \text{(V)} \\ S_1 = 1,9 (F_2 - F_1) & \text{(VIa)} \\ & = 0,95 (R_2 - R_1) \text{ (VIb)} \end{array} \quad \begin{array}{ll} S_x = 1,9 F_2 & \text{(VII)} \\ Z = R_3 - F_2 - F_3 \text{ oder} & \text{(VIIIa)} \\ Z = R_3 - 1,55 F_2 & \text{(VIIIb)} \\ D = G_3 - G_2 \text{ oder} & \text{(IX)} \\ D = (R_3 - F_3) - (R_2 - F_2) \text{ oder} & \text{(IXa)} \\ D = R_3 - R_2 + 0,45 F_2 & \text{(IXb)} \end{array}$$

Die Gleichungen VIIIa und VIIIb beruhen auf folgender Überlegung:

Bei völliger Hydrolyse entsteht aus Stärkesirup Glucose, und zwar nach den Versuchen von KRUISHEER fast genau die Menge, die dem Extrakt nach S. 837 entspricht. Aus diesem Grunde vermeidet KRUISHEER die sonst übliche Umrechnung des Zuckers auf Dextrin mit einem Faktor (vgl. S. 912).

Bei der starken Inversion wird ein Teil der Fructose zerstört, während die Glucose völlig erhalten bleibt. Es gelten also für die Zusammensetzung der Gemische folgende Verhältnisse:

| Saccharose + Invertzucker  | Stärkesirup (Stärkezucker) |
|--|----------------------------|
| Vor der Inversion:   |                            |
| Saccharose + Glucose + Fructose + ... + Glucose + Maltose <sup>1</sup> + Dextrin.        |                            |
| Nach der Inversion:  |                            |
| Glucose ( $G_A$ ) + Fructose ( $F_2$ ) + ... + Glucose + Maltose <sup>1</sup> + Dextrin. |                            |
| Nach starker Inversion:  |                            |
| Glucose ( $G_B$ ) + Fructose ( $F_3$ ) + ...   | Glucose ( $G_Z$ ).         |

Nach starker Inversion ist also

$$R_3 = G_B + F_3 + G_Z \text{ oder } G_Z = R_3 - G_B - F_3.$$

Wenn man nun — für Saccharose und Invertzucker —  $G_B = G_A = F_2$  setzt, wird also  $G_Z = R_3 - F_2 - F_3$ .

$G_Z$  entspricht aber, wie oben gezeigt, dem Extraktgehalt, also

$$G_Z = Z \text{ oder } Z = R_3 - F_2 - F_3 \quad \text{(VIIIa)}$$

Dieselbe Gleichung gilt natürlich auch für Stärkezucker.

Nun wird bei der starken Inversion ein Teil der Fructose zerstört, und zwar ist diese Menge bei Arbeiten unter gleichen Versuchsbedingungen konstant, bei der obigen Vorschrift 45% der vorhandenen Menge. Somit kann man in guter Annäherung setzen:  $F_3 = 0,55 F_2$ .

Damit wird aus Gleichung VIIIa:  $Z = R_3 - 1,55 F_2$ . (VIIIb)

Unter „Dextrin“ versteht KRUISHEER alle Stoffe, die bei der starken Inversion Glucose liefern<sup>2</sup>, also

$$D = G_3 - G_2 \quad \text{(IX)}$$

Die Gleichung (IXa) entsteht durch Einsetzen der Werte aus II und III in IX, daraus IXb, indem wieder  $F_3 = 0,55 F_2$  gesetzt ist.

### b) Bestimmung von Saccharose und Fructosanen nebeneinander.

Nach weiteren Versuchen von KRUISHEER<sup>3</sup> werden sowohl das von J. TILLMANS, H. HOLL und L. JARIWALA<sup>4</sup> in Roggenmehl aufgefundene Trifruktoseanhydrid wie überhaupt alle in den Pflanzen vorkommenden Inuloide bei

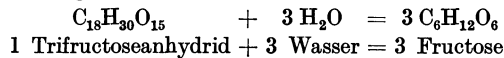
<sup>1</sup> Als Bestandteil von Stärkesirup.

<sup>2</sup> Dadurch wird also auch die Maltose zu  $\frac{1}{2}$  als „Dextrin“ gemessen. Der Wert für „Dextrin“ muß somit höher als nach den S. 910 besprochenen Methoden ausfallen.

<sup>3</sup> C. J. KRUISHEER: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1930, 49, 841 u. 1931, 50, 153.

<sup>4</sup> J. TILLMANS, H. HOLL u. L. JARIWALA: Z. 1928, 56, 26.

der schwachen Inversion völlig gespalten. Wenn man nun annimmt, daß entsprechend der Gleichung



486,2 g Anhydrid 540,2 g Fructose entsprechen, so müßte also der bei der Inversion entstandene Fructosegehalt mit  $\frac{486,2}{540,2} = 0,90$ mal genommen werden.

Nun findet sich aber in den aus alkoholischer Lösung mit Natronlauge nach TILLMANS, HOLL und JARIWALA erhaltenen Niederschläge neben dem Trifruktoseanhydrid bzw. neben Fructosanen meistens auch Saccharose vor, die ebenfalls bei der Inversion Fructose liefert. Um diese Störung auszuschalten, bestimmt KRUISHEER außer  $F_2$ , dem Fructosegehalt nach Inversion, noch  $R_2$ , das gesamte Reduktionsvermögen und setzt dann die Differenz gleich der von der Saccharose gelieferten Glucose

$$G_2 = R_2 - F_2.$$

Diese Glucose  $G_2$  entspricht in der Saccharose einer gleich großen Menge Fructose. Also muß der Gesamt-Fructosegehalt um eine gleich große Menge von  $(R_2 - F_2)$  vermindert werden, um die Fructosemenge aus dem Trifruktoseanhydrid zu liefern:

$$T = 0,90 [F_2 - (R_2 - F_2)], \text{ oder } = 0,90 (2F_2 - R_2).$$

Die Saccharose  $S$  findet man durch Malnehmen der Glucose mit 1,90, also

$$S = 1,90 G_2 = 1,90 (R_2 - F_2).$$

KRUISHEER war es möglich, nach dieser Arbeitsweise auch in Weizenmehl das Vorkommen kleiner Mengen von Fructosan (Trifruktosenanhydrid?) nachzuweisen. Er fand ferner, daß zum quantitativen Niederschlagen des Trifruktoseanhydrids die von TILLMANS, HOLL und JARIWALA vorgeschriebene Menge Natronlauge nicht genügt, und wendete daher folgende Arbeitsweise an:

Von dem zu prüfenden Stoffe (Mehl) werden 12,5 g mit 50 ccm 70%igen Alkohol in einem mit einem Kautschukstopfen verschlossenen ERLÉNMEYER-Kölbchen während einer Stunde wiederholt kräftig umgeschüttelt und dann abfiltriert (nötigenfalls zentrifugiert); 25 ccm des Filtrats werden in ein Schleuderröhrchen pipettiert und mit 5 ccm N.-Natronlauge, gelöst in 70%igen Alkohol<sup>1</sup>, versetzt und gut gemischt. Am nächsten Tage wird zentrifugiert, wobei der ganze Niederschlag an der Wand des Glases haften bleibt; die obenstehende Flüssigkeit wird jetzt einfach abgegossen (nur in seltenen Fällen ist die Benutzung eines kleinen Filters dabei erforderlich), und der Rückstand zweimal mit 2 ccm 70%igem Alkohol gewaschen. Der Niederschlag wird in 10 ccm warmen Wassers gelöst und gegen Methyloorange mit 0,25 N.-Schwefelsäure neutralisiert. Die Flüssigkeit wird sodann mit noch 50 ccm Wasser in ein 50 ccm-Maßkölbchen gespült und nach Zusatz von 2,5 ccm Salzsäure (30 gew.-%ig = 9,5 N) während 10 Minuten bei 69–70° invertiert. Nach Kühlung, Neutralisation und abermaliger Kühlung wird zur Marke aufgefüllt.

In 10 ccm dieser Flüssigkeit wird das Gesamt-Reduktionsvermögen  $R_2$ , vorzugsweise nach SCHOORL mit der LUFFSchen Kupferlösung (S. 871) bestimmt, und das Ergebnis in Prozente der ursprünglichen Substanzmenge ausgerechnet ( $R_2$ ).

Zur Bestimmung des Fructosegehaltes  $F_2$  pipettiert man 20 ccm der invertierten Flüssigkeit in ein 50 ccm-Maßkölbchen und unterwirft diese der Behandlung mit Hypojodit (S. 896). Nur ist hier die ganze Bearbeitung mit der Hälfte der dort beschriebenen Substanzmenge und aller Reagenzien ausgeführt, also mit 25 ccm 4 N.-Natronlauge, 8 ccm Jodlösung, usw. Nachdem schließlich zur Marke aufgefüllt ist, bestimmt man das Reduktionsvermögen in 25 ccm, und drückt das Ergebnis in Prozenten Fructose der ursprünglichen Substanz aus ( $F_2$ ).

Aus  $R_2$  und  $F_2$  berechnet man die Menge des Trifruktoseanhydrids ( $T$ ) und gegebenenfalls auch der Saccharose mit Hilfe der oben angegebenen Gleichungen.

Eine Prüfung des Filtrates ergab, daß durch die beschriebene Behandlung das Trifruktoseanhydrid praktisch quantitativ niedergeschlagen wird, nicht aber die Saccharose, die nur teilweise mit ausfällt.

<sup>1</sup> Vgl. S. 860.

Das Inulin in den Pflanzen ist nach KRUISHEER<sup>1</sup> stets von etwa 10% Glucose begleitet. Auch gereinigte Inulinpräparate sind nicht glucosfrei.

Das von WOHL entdeckte Laevulosin, das bei der Säurehydrolyse von Saccharose als Reversionsprodukt aus Fructose entsteht kann erst durch starke Inversion zerlegt werden, ein Umstand, den KRUISHEER zu seinem Nachweis, z. B. als Bestandteil von Kunsthonig benutzt.

Das gleiche ist bei der durch schwache Inversion aus Melezitose entstehenden Turanose (vgl. S. 859) der Fall.

### 3. Maltose neben Glucose und Dextrin.

Die Bestimmung der Maltose neben Glucose und Dextrin, wie sie für die Analyse von Stärkesirup besondere Bedeutung hat, ist mittels FEHLINGScher Lösung allein nicht durchführbar, weil die erhaltene Reduktion lediglich ein Maß für die Gesamtmenge der Gewichtsmoleküle an Glucose + Maltose liefert. Erst durch Anwendung von Kupferacetatlösung + Essigsäure (BARFOEDS Reagens) unter bestimmten Bedingungen gelingt es, die Glucose zu oxydieren, ohne daß Maltose beeinflußt wird.

Nach G. STEINHOFF<sup>2</sup> haften indes dem BARFOEDSchen Reagens, das, aus 54,5 g wasserfreiem Kupferacetat und 7,2 g Eisessig durch Lösen zum Liter bereitet, ein  $p_H$  von 5,4 aufweist, verschiedene Mängel an. Ein besonderer Nachteil war die Empfindlichkeit des Reagens gegen Salze, besonders Sulfate, die auch seine Herstellung aus Kupfersulfat ausschließen. Sodann wirkt eine Kochung mit dem Reagens entsprechend dem ziemlich hohen Säuregrad etwas hydrolysierend auf Maltose, wodurch die Glucosewerte fehlerhaft erhöht werden. Schließlich ist die direkte Kupferoxydultitration mit Jodlösung nach S. 865 durch Ausscheidung basischer Salze beim Zusatz von Natriumbicarbonat gestört. Diese Nachteile schaltet STEINHOFF durch Zusatz von Natriumacetat nach der folgenden Vorschrift aus und erreicht insbesondere den Vorteil, daß seine Lösung auf ein  $p_H$  von 6,4 kommt, also nahezu neutral wird.

Die Analyse einer Mischung von Maltose mit Glucose und Dextrin (z. B. Stärkesirup) gestaltet sich nun nach STEINHOFF wie folgt:

Von einer 1%igen Siruplösung<sup>3</sup> werden

I. 10 ccm in einem 200-ccm-ERLENMEYER-Kolben mit 10 ccm FEHLINGScher Lösung I (69,26 g krystallisches Kupfersulfat im Liter, vgl. S. 862), 20 ccm Natriumacetatlösung (500 g des krystallischen Salzes im Liter) (Lösung III) und 10 ccm Wasser,

II. 10 ccm in einem weiteren 200-ccm-ERLENMEYER-Kolben mit je 10 ccm FEHLINGScher Lösung I und II (vgl. S. 862, unter b) und 20 ccm Wasser gemischt.

III. 50 ccm nach Zusatz von 25 ccm 3 N.-Salzsäure 2 $\frac{1}{2}$  Stunden im siedenden Wasserbade am Steigrohr hydrolysiert (vgl. S. 912), mit Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert und auf 100 ccm aufgefüllt. — Von dieser Lösung werden 20 ccm in einem dritten 200-ccm-ERLENMEYER-Kolben mit je 10 ccm FEHLINGScher Lösung I und II und 10 ccm Wasser gemischt.

Nun werden alle drei ERLENMEYER-Kolben in ein siedendes Wasserbad gestellt, 20 Minuten darin gehalten und das abgeschiedene Kupferoxydul in jedem Kolben nach der Vorschrift S. 865 jodometrisch titriert.

Die Titrationswerte liefern nach folgender Tabelle 14 die einzelnen Zuckerarten wie folgt:

Die Glucose liefert Versuch I unmittelbar aus Spalte 2 der Tabelle.

Die Maltose liefert Versuch II, wenn man den Einfluß der Glucose abzieht. Zu diesem Zweck wird der bei Versuch I erhaltene Wert zunächst in Kubikzentimeter auf den Betrag umgerechnet, der einer Behandlung mit FEHLINGScher Lösung entsprechen würde, und vom Filtrationsergebnis abgezogen. Für diese Umrechnung wird nebenstehende Hilfstabelle 15 benutzt. Der Rest liefert nach Spalte 3 in Tabelle 14 die Maltose.

<sup>1</sup> C. J. KRUISHEER: Chem. Weekbl. 1933, 30, 154.

<sup>2</sup> G. STEINHOFF: Privatmitteilung. Vgl. Zeitschr. Spiritusind. 1933, 56, 64.

<sup>3</sup> Oder einer zur Glucosebestimmung üblichen Lösung von 8,75 g Sirup in 500 ccm Wasser.

Tabelle 14. Berechnung des Zuckergehaltes aus dem Verbrauch an Jodlösung.

| Verbrauch an 0,1 N.-Jodlösung ccm | Glucose mit Lösung I + III | Maltose mit Lösung I + II | Gesamtglucose mit Lösung I + II | Verbrauch an 0,1 N.-Jodlösung ccm | Glucose mit Lösung I + III | Maltose mit Lösung I + II | Gesamtglucose mit Lösung I + II |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 1                                 | 6,1                        | 5,0                       | 3,2                             | 16                                | 52,8                       | 89,0                      | 52,8                            |
| 2                                 | 8,6                        | 10,5                      | 6,3                             | 17                                | 58,6                       | 95,0                      | 56,3                            |
| 3                                 | 11,2                       | 16,0                      | 9,4                             | 18                                | 66,0                       | 101,0                     | 59,8                            |
| 4                                 | 13,4                       | 21,5                      | 12,6                            | 19                                | 73,4                       | 107,0                     | 63,3                            |
| 5                                 | 15,6                       | 27,0                      | 15,9                            | 20                                | 80,0                       | 112,5                     | 66,9                            |
| 6                                 | 18,1                       | 32,5                      | 19,2                            | 21                                | 88,4                       | 118,5                     | 70,7                            |
| 7                                 | 20,5                       | 38,0                      | 22,4                            | 22                                | 96,2                       | 124,5                     | 74,5                            |
| 8                                 | 23,2                       | 43,5                      | 25,6                            | 23                                | —                          | 130,5                     | 78,5                            |
| 9                                 | 25,8                       | 49,0                      | 28,9                            | 24                                | —                          | 136,5                     | 82,6                            |
| 10                                | 28,4                       | 55,0                      | 32,3                            | 25                                | —                          | 142,5                     | 86,6                            |
| 11                                | 31,2                       | 60,5                      | 35,7                            | 26                                | —                          | 148,5                     | 90,7                            |
| 12                                | 34,2                       | 66,0                      | 39,0                            | 27                                | —                          | 154,5                     | 94,8                            |
| 13                                | 37,3                       | 72,0                      | 42,4                            |                                   |                            |                           |                                 |
| 14                                | 40,5                       | 78,0                      | 45,8                            |                                   |                            |                           |                                 |
| 15                                | 46,8                       | 83,5                      | 49,3                            |                                   |                            |                           |                                 |

Tabelle 15. Umrechnung der Titrationswerte für Kupferacetatlösung auf Titrationswerte mit FEHLINGScher Lösung.

| Acetat-lösung ccm | FEHLING-Lösung ccm | Zwischenwerte | Acetat-lösung ccm | FEHLING-Lösung ccm | Zwischenwerte | Acetat-Lösung ccm | FEHLING-Lösung ccm | Zwischenwerte |
|-------------------|--------------------|---------------|-------------------|--------------------|---------------|-------------------|--------------------|---------------|
| 1                 | 1,9                | 0,8           | 9                 | 8,1                | 0,8           | 17                | 17,7               | 2,1           |
| 2                 | 2,7                | 0,9           | 10                | 8,9                | 0,8           | 18                | 19,8               | 2,0           |
| 3                 | 3,6                | 0,7           | 11                | 9,7                | 0,9           | 19                | 21,8               | 1,6           |
| 4                 | 4,3                | 0,6           | 12                | 10,6               | 0,9           | 20                | 23,4               | 2,0           |
| 5                 | 4,9                | 0,8           | 13                | 11,5               | 0,9           | 21                | 25,4               | 1,9           |
| 6                 | 5,7                | 0,7           | 14                | 12,4               | 0,9           | 22                | 27,3               |               |
| 7                 | 6,4                | 0,9           | 15                | 14,3               | 1,7           |                   |                    |               |
| 8                 | 7,3                | 0,8           | 16                | 16,0               | 1,7           |                   |                    |               |

Zur Berechnung der Dextrine wird die nach Versuch III und Tabellenspalte 4 ermittelte Gesamtglucose um die ursprüngliche Glucose (I) und die Maltose (II) vermindert und der Rest mit 0,9 malgenommen.

Von sonstigen Verfahren zur Bestimmung der Maltose neben Glucose und Dextrin kommen in Frage:

a) Das Gärverfahren mit verschiedenen Hefen nach S. 911.

b) Die Entfernung der Dextrine durch Alkohol nach S. 910 und die Bestimmung von Maltose und Glucose in dem löslichen Teil. In diesem Falle kann die Drehungsabnahme durch Natriumbisulfit nach Y. TOMODA und T. TAGUCHI<sup>1</sup> verwertet werden, um die Glucose zu bestimmen. Hierbei ist, um genauere Werte zu erhalten, neben den Polarisationswerten aber auch die Drehungsabnahme der reinen Maltose zu berücksichtigen.

Da bei der Ausfällung mit Alkohol leicht Maltose mit abgeschieden wird, sind die Ergebnisse dafür weniger zuverlässig als für Glucose.

#### 4. Maltose neben Saccharose und Invertzucker.

Die Bestimmung der Maltose neben Saccharose kann mit FEHLINGScher Lösung (S. 861) oder mit LUFFScher Lösung (S. 871) erfolgen.

Bei Gegenwart von Invertzucker kann man dessen Menge aus dem Fructosegehalt nach S. 895 finden und in Rechnung setzen.

<sup>1</sup> Vgl. S. 879.

## 5. Lactose neben anderen Zuckern.

a) In Lösungen, die außer Lactose nur noch Saccharose enthalten, kann die Bestimmung der Lactose mittels FEHLINGScher Lösung (vgl. TH. v. FELLEBERG<sup>1</sup>) oder mit Hypojodit nach S. 890 vorgenommen werden. Auch eignet sich für diesen Zweck das Kalkverfahren in Verbindung mit der Polarisation nach FINCKE (S. 884), indem man die Drehung vor und nach Erhitzen mit Kalk feststellt und aus der Drehungsverminderung indirekt den Milchzuckergehalt ableitet.

Besondere Formeln zur Errechnung von Lactose und Saccharose aus den Polarisationswerten hat A. RINCK<sup>2</sup> angegeben.

Wenn ein Teil der Saccharose neben Lactose invertiert ist, sind die vorstehend erwähnten Methoden nicht mehr anwendbar. Nur in dem selteneren Falle, wenn neben Lactose nur Saccharose und Invertzucker vorhanden sind, kann der Lactosegehalt aus der Drehung des Zuckers nach Inversion abgeleitet werden (vgl. J. GROSSFELD<sup>3</sup>). Im übrigen dienen für die Bestimmung der Lactose dann folgende Verfahren:

a) Gesonderte Ermittlung der Monosen mit Kupferacetatlösung (BARFOEDS Reagens), das Lactose ebenso wie Maltose nicht oxydiert (O. SVANBERG<sup>4</sup>). J. FITELSON<sup>5</sup> fand dasselbe auch zur Prüfung von Glucose neben Lactose und Saccharose geeignet. Durch Behandlung einerseits mit diesem Reagens, andererseits mit FEHLINGScher Lösung erhält man Zuckerwerte, deren Differenz ein Maß für den Lactose- (bzw. Lactose- + Maltose-)gehalt liefert. Allerdings bedarf es noch einer genaueren Feststellung, in welchem Maße die Saccharose bei der Behandlung durch BARFOEDS Reagens invertiert wird und wie sich Fructose in quantitativer Hinsicht gegen dasselbe verhält. Auch die Methode von STEINHOFF (S. 900) scheint hier Vorteile durch den niedrigen Säuregrad der Lösung zu bieten.

b) Das Gärverfahren vgl. S. 906. Vergärt man ein Zuckergemisch einerseits mit einer Hefe, die Galaktose nicht, andererseits mit einer Hefe, die auch Galaktose vergärt, so entspricht der Unterschied in der Menge der entwickelten Kohlensäure dem Gehalte an Galaktose nach folgenden Endgleichungen:

1. Hefe:  $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2 CO_2 + 2 C_2H_5OH + C_6H_{12}O_6$  Galaktose,
2. Hefe:  $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4 CO_2 + 4 C_2H_5OH$ .

Je 1 g Unterschied in der entwickelten Menge Kohlendioxyd entsprechen also 4,09 g Lactosehydrat.

Nach J. KÖNIG<sup>6</sup> eignet sich zur Vergärung sämtlicher Zuckerarten am besten Hefe aus Kefirkörnern. Nach neueren Versuchen von E. SCHMIDT, F. TREFZ und H. SCHNEGG<sup>7</sup> vergärt Münchener untergärige Löwenbräu-Hefe Zymohexosen und Galaktose quantitativ. Als Hefe, die Galaktose nicht vergärt, empfehlen W. SCHUT und L. E. DEN DOOREN DE JONG<sup>8</sup> besonders *Torula monosa*. Da auch gewöhnliche Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Lactose nicht vergärt, wird nach M. W. FUHRI SNETHLAGE<sup>9</sup> die Zuckerlösung (Brotauszug) 30 Stunden bei 30° damit vergoren und die Lactose als

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1931, **22**, 9.

<sup>2</sup> Z. 1933, **65**, 616.

<sup>3</sup> J. GROSSFELD: Z. 1933, **65**, 616.

<sup>4</sup> O. SVANBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1930, **188**, 219.

<sup>5</sup> J. FITELSON: Journ. Assoc. official. agricult. Chemists 1932, **15**, 618.

<sup>6</sup> J. KÖNIG: Privatmitteilung.

<sup>7</sup> E. SCHMIDT, F. TREFZ u. H. SCHNEGG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, **59**, 2635.

<sup>8</sup> W. SCHUT u. L. E. DEN DOOREN DE JONG: Chem. Weekbl. 1925, **22**, 517; C. 1926, I, 788.

<sup>9</sup> M. W. FUHRI SNETHLAGE: Chem. Weekbl. 1926, **23**, 578.

Restreduktion gefunden. — Störungen dabei durch *Bacillus mesentericus* verhindert W. MEYER<sup>1</sup> durch Behandlung mit Quecksilberchlorid<sup>2</sup>.

SCHUT und DEN DOOREN DE JONG führen die Gärung bei wäßrigen Brotauszügen nach Zusatz von 1%igem Peptonwasser als Stickstoffquelle für die Hefe in dem Apparat von KLUYVER (S. 907) aus.

Bei der Vergärung von Zuckerlösungen ist besonders auf Abwesenheit von Hefegiften sorgfältig zu achten. Auch Kochsalz in erheblicherer Konzentration kann die Wirkung von Hefen mehr oder weniger stark hemmen.

c) Für die Bestimmung der Galaktose und der Lactose durch Überführung in Schleimsäure hat A. W. VAN DER HAAR<sup>3</sup> eine Verbesserung der ursprünglichen Vorschrift von B. TOLLENS<sup>4</sup> und W. H. KENT<sup>5</sup> angegeben, der die folgende<sup>6</sup> entspricht:

Von den zu prüfenden Zuckergemischen wird je 1 g in gewogenen Bechergläsern von 12 cm Höhe und 60 mm Bodendurchmesser mit 60 ccm Salpetersäure (spez. Gewicht 1,15 bei 15°) in einem siedenden Wasserbade unter wiederholtem Umschwenken in schräger Stellung erhitzt, bis das Gewicht des Inhaltes auf etwas unter 20 g (19,8—20 g) abgenommen hat. Dann wird mit Wasser auf 20 g ergänzt und werden 500 mg reine trockene Schleimsäure zugefügt<sup>7</sup>. Darauf wird 48 Stunden bei möglichst 15° unter zeitweisem Umschwenken stehen gelassen. Dann wird der Niederschlag zweckmäßig durch einen Filtertiegel aus Jenaer Glas<sup>8</sup> abfiltriert, viermal mit 5 ccm einer bei 15° gesättigten wäßrigen Schleimsäurelösung und schließlich mit 5 ccm Wasser gewaschen und dann bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das erhaltene Gewicht vermindert man um 500 mg für die zugesetzte Schleimsäure.

Für die Berechnung der Galaktose hat VAN DER HAAR zwei Tabellen, eine für Galaktose direkt, und eine für mit Saccharose auf 1 g ergänzte Galaktosemengen angegeben. Aus letzterer wurde die folgende Tafel umgerechnet<sup>9</sup>:

Tabelle 16. Berechnung der Galaktose aus der gefundenen Schleimsäuremenge.

| Schleimsäure<br>mg | Zehner       |     |     |     |     |     |     |     |      |     |
|--------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
|                    | 00           | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  | 70  | 80   | 90  |
|                    | mg Galaktose |     |     |     |     |     |     |     |      |     |
| 000                | —            | 22  | 37  | 52  | 67  | 82  | 96  | 110 | 124  | 137 |
| 100                | 150          | 164 | 179 | 194 | 210 | 226 | 241 | 255 | 268  | 281 |
| 200                | 294          | 308 | 322 | 336 | 350 | 363 | 375 | 386 | 397  | 408 |
| 300                | 420          | 432 | 445 | 458 | 471 | 485 | 500 | 513 | 526  | 539 |
| 400                | 552          | 564 | 576 | 588 | 601 | 615 | 629 | 643 | 656  | 669 |
| 500                | 682          | 694 | 706 | 718 | 730 | 742 | 754 | 766 | 778  | 790 |
| 600                | 801          | 812 | 823 | 834 | 845 | 856 | 867 | 878 | 889  | 900 |
| 700                | 911          | 922 | 933 | 944 | 955 | 966 | 977 | 989 | 1000 | —   |

<sup>1</sup> W. MEYER: Chem. Weekbl. 1933, 30, 317.

<sup>2</sup> 10 ccm Brotauszug und 10 ccm 0,2%ige Quecksilberchloridlösung werden in 15 Minuten auf etwa die Hälfte eingekocht, das Quecksilber mit 5 Tropfen Schwefelammonium ausgefällt, aufgeköcht, 5 ccm 1%ige Peptonlösung zugefügt, mit Wattepfropfen verschlossen, auf 10—20 ccm eingedampft und dann vergoren.

<sup>3</sup> A. W. VAN DER HAAR: Chem. Weekbl. 1916, 13, 1204; C. 1917, I, 279; vgl. A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 123.

<sup>4</sup> B. TOLLENS: Liebigs Annalen 1886, 232, 186.

<sup>5</sup> W. H. KENT: Diss. Göttingen 1884.

<sup>6</sup> Mit unwesentlichen Änderungen.

<sup>7</sup> Zusatz und spätere Abrechnung von Schleimsäure wurden zuerst von R. CREYDT (Dissertation, Göttingen 1888) angewendet.

<sup>8</sup> VAN DER HAAR empfiehlt GOOCH-Tiegel und Asbest.

<sup>9</sup> Aus der Kurve herausfallende Werte (innerhalb der Versuchsfehlergrenze) wurden ausgeglichen.



Aus der gefundenen Galaktose erhält man den entsprechenden Lactosegehalt (als Lactosehydrat) durch einfache Verdoppelung.

Aus Lactose selbst erhielt VAN DER HAAR, indem er mit Saccharose auf 1000 g ergänzte, in je 3 Versuchen:

|                        |     |             |             |
|------------------------|-----|-------------|-------------|
| Eingewogene Lactose    | mg: | 500         | 625         |
| Gefundene Schleimsäure | mg: | 166,5—172,5 | 212,0—220,0 |
| Entsprechend Galaktose | mg: | 251,9—259,4 | 310,0—321,4 |
| Berechnete Galaktose   | mg: | 250,0       | 312,5       |

Die Ergebnisse sind also etwas höher als obige, durch Ergänzung von Galaktose mit Saccharose auf 1 g erhaltenen Tabellenwerte. Doch kann die Abweichung gegenüber den unvermeidlichen Versuchsfehlern vernachlässigt werden.

Nach VAN DER HAAR liefert die Galakturonsäure bereits in der Kälte mit Bromwasser Schleimsäure, woran sie erkannt werden kann. Gegebenenfalls ist auch auf die Gegenwart von Raffinose Rücksicht zu nehmen, die aus je 1 Molekül Fructose, Glucose und Galaktose besteht (vgl. S. 858).

## G. Nachweis und Bestimmung der Zuckerarten durch Vergärung.

### 1. Verhalten der Zuckerarten gegen Hefe.

Nach P. LINDNER<sup>1</sup> verhalten sich die einzelnen Hefen gegen die Zuckerarten und Dextrine, wie folgt<sup>2</sup>:

Tabelle 17.

| Bezeichnung der Hefe <sup>3</sup>         | Glucose | Fructose | Maltose | Saccharose | Dextrin |
|---|---------|----------|---------|------------|---------|
| <i>Saccharomyces apiculatus</i> . . . . . | +       | +        | —       | —          | —       |
| <i>Torula pulcherrima</i> . . . . .       | +       | +        | —       | —          | —       |
| Torula aus Mazun . . . . .                | +       | +        | —       | —          | —       |
| Sacch. Marxianus . . . . .                | +       | +        | —       | +          | —       |
| Sacch. Ludwigii . . . . .                 | +       | +        | —       | +          | —       |
| Hefe aus Kibleytschi . . . . .            | +       | +        | —       | +          | —       |
| Hefe aus armenischem Mazun . . . . .      | +       | +        | —       | +          | —       |
| Hefe aus Zuckerrohrmelasse . . . . .      | +       | +        | +       | —          | —       |
| Sacch. Saaz, untergärig . . . . .         | +       | +        | +       | +          | —       |
| Hefe aus Danziger Jopenbier . . . . .     | +       | +        | +       | +          | —       |
| Schizo-Sacch. Pombe . . . . .             | +       | +        | +       | +          | +       |
| Sacch. Logos . . . . .                    | +       | +        | +       | +          | +       |
| <i>Sachsia suaveolens</i> . . . . .       | +       | +        | +       | +          | +       |
| <i>Monilia variabilis</i> . . . . .       | +       | +        | +       | +          | +       |

### 2. Vergärung nach P. HÖRMANN und J. KÖNIG.

Nach P. HÖRMANN und J. KÖNIG<sup>4</sup> eignet sich zur Trennung der Dextrine von einzelnen und sämtlichen Zuckerarten (Glucose, Fructose, Maltose und Saccharose) die Hefe aus Danziger Jopenbier am besten; zur Trennung der Dextrine von Glucose, Fructose und Saccharose kann *Saccharomyces Marxianus* verwendet werden, jedoch vergärt diese Hefe die letzten Reste Saccharose nur langsam; hat man dagegen neben Dextrinen nur Glucose

<sup>1</sup> P. LINDNER: Wschr. Brauerei 1900, 17, 49.

<sup>2</sup> In der Tabelle bedeutet das Zeichen +, daß Gärung eintritt, das Zeichen —, daß solche unterbleibt.

<sup>3</sup> Die Hefen können durch das Institut für Gärungsgewerbe in Berlin N. 65, Seestr. 12, bezogen werden.

<sup>4</sup> P. HÖRMANN und J. KÖNIG: Z. 1907, 13, 113 u. P. HÖRMANN: Trennung der Kohlenhydrate durch Reinhefen. Inaug.-Diss. Münster i. W. 1906.

und Fructose bzw. Invertzucker in Lösung, so läßt sich zweckmäßig *Torula pulcherrima* zur Trennung anwenden.

Die Vergärung wird, wie folgt, vorgenommen:

Die annähernd 5 g Trockensubstanz entsprechende Menge Kohlenhydrate, die völlig frei von Hefegiften sein müssen, wird in etwa 100 ccm RAULINScher Lösung gelöst und in eine Vergärungsvorrichtung von untenstehender Anordnung (Abb. 5) gebracht; *a* ist der Gärkolben, *b*, *c*, *d*<sup>1</sup> und *e* sind Chlorcalciumrohre; die kleinen Chlorcalciumrohre *c* und *e* dienen nur als Schutzrohre, um den Wasserzutritt aus der Luft zu dem Apparat zu verhüten; sie werden vor jedem Wägen des ganzen Apparates abgenommen und danach wieder aufgesetzt.

Die RAULINSche Nährsalzlösung enthält in 1500 ccm Wasser:

|  |        |                           |        |
|--|--------|---------------------------|--------|
| Ammoniumtartrat <sup>2</sup> . . . . . | 4,0 g  | Kaliumsilicat . . . . .   | 0,4 g  |
| Ammoniumnitrat . . . . .               | 4,0 „  | Magnesiumsulfat . . . . . | 0,4 „  |
| Ammoniumphosphat . . . . .             | 0,6 „  | Eisensulfat . . . . .     | 0,07 „ |
| Ammoniumsulfat . . . . .               | 0,25 „ | Zinksulfat . . . . .      | 0,07 „ |
| Kaliumcarbonat . . . . .               | 0,6 „  |                           |        |

Die schwach alkalisch reagierende Lösung wird vor jedem Gebrauch neutralisiert und sterilisiert. Bei Vergärung von natürlichen Fruchtsäften oder Pflanzenauszügen, die genügend mineralische Nährstoffe für die Hefe enthalten, ist die Anwendung der RAULINSchen Lösung nicht notwendig.

Die genannten Reinhefen werden zweckmäßig auf Bierwürze-Agar aufbewahrt; für die Verwendung entnimmt man hiervon mittels eines sterilen Platindrahtes zwei Ösen voll und füllt sie in Reagensrohre mit sterilisierter Bierwürze. Nach der Vergärung wird die verbrauchte Bierwürze abgossen, durch neue sterilisierte Bierwürze so oft ersetzt, bis man eine genügende Menge gärkräftige Hefe erhalten hat; dann wird die Bierwürze abgossen und die Hefe in den Gärkolben *a* übergeführt. — Die in Maltoselösungen nicht gärenden Hefen werden in sterilisierter Lösung von Invertzucker in Hefenwasser vermehrt.

Nach Überführung der Hefe in den Gärkolben wird dieser mit dem die Chlorcalciumrohre tragenden Gummipropfen verschlossen, ohne die kleinen Rohre *c* und *e* gewogen und dann, nachdem man die letzteren Schutzrohre aufgesetzt hat, in einen Thermostaten von beständig 30–32° gebracht. Nach 24stündigem Stehen im Thermostaten wird durch den Kolben zunächst mittels eines Aspirators ein langsamer Luftstrom geleitet, der Kolben nach Entfernung der Schutzrohre gewogen und dieses jeden Tag so lange fortgesetzt, bis keine Gewichtsabnahme des Apparates mehr festgestellt werden kann. Das dauert durchweg 5–6 Tage — bei natürlichen Pflanzenauszügen und Fruchtsäften weniger lange —. Die Gärung wird als beendet angesehen, wenn die Gewichtsveränderung gleich der eines Kontrollkolbens ist, der mit der gleichen Menge der sterilisierten Kohlenhydratlösung ohne Hefenzusatz gefüllt ist und im übrigen ebenso wie die Gärkolben behandelt wird. Nach beendeter Gärung wird die Hefe mikroskopisch auf Reinheit und der Gärrückstand im Kolben qualitativ bzw. quantitativ auf Zuckergehalt geprüft. Noch vorhandene geringe Mengen Zucker lassen sich von den Dextrinen durch Fällen mit Alkohol

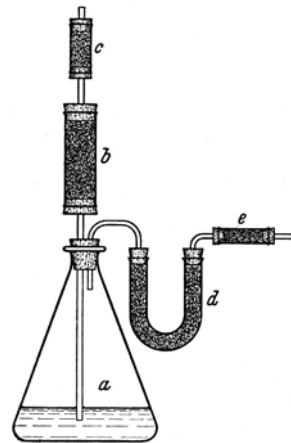


Abb. 5. Gärkolben.

<sup>1</sup> Statt des Chlorcalciumrohres *d* kann auch ein kleines Gefäß mit konz. Schwefelsäure verwendet werden.

<sup>2</sup> Die eigentliche RAULINSche Vorschrift fordert 4,0 g Weinsäure; es empfiehlt sich aber nicht, diese hier anzuwenden, weil sie beim Sterilisieren bzw. Erwärmen der Gärflüssigkeit eine teilweise Inversion der Saccharose und Dextrine herbeiführen kann.

nach S. 910 entfernen; bei vorhandenen größeren Mengen müßte die Gärung nach Sterilisierung des Kolbeninhaltes und nach Zusatz von frischer gärkräftiger Hefe fortgesetzt oder mit einer neuen Probe wiederholt werden.

Aus dem Gewichtsverlust der Kolben an Kohlensäure läßt sich der Gehalt an Zucker (vgl. folgenden Absatz) berechnen, während der Rückstand im Kolben nach der Filtration nach S. 910 auf Dextringehalt untersucht wird.

Sind in einer wäßrigen Lösung nur Glucose und Fructose bzw. Invertzucker neben Dextrinen zu bestimmen, so geschieht dieses am besten durch *Torula pulcherrima*, die weder Saccharose, noch Maltose, noch Dextrine — mit Ausnahme von Honigdextrin — angreift. Die Gärung wird, wie S. 905 angegeben ist, vorgenommen und der Gewichtsverlust an Kohlensäure unter der Voraussetzung, daß bei der Gärung 5% Nebenerzeugnisse entstehen, mit 2,155 multipliziert, um die entsprechende Menge von Glucose und Fructose bzw. Invertzucker zu finden.

Handelt es sich um Bestimmung der Maltose allein neben Dextrinen, so kann man die untergärrige Hefe *Sacchar. cerevisiae* Saaz oder die Hefe aus Danziger Jopenbier verwenden, die beide die Dextrine nur schwach angreifen. In diesem Falle multipliziert man den Kohlensäureverlust mit 2,05, um die Maltose zu berechnen.

3. Für qualitative Gärversuche mit Monosen eignen sich nach A. W. VAN DER HAAR<sup>1</sup> die einfachen Gärröhrchen von SCHRÖTTER-EINHORN (vgl. den Abschnitt „Mykologische Untersuchungen“, Stoffwechselprodukte S. 1612), in denen z. B. Glucose, Fructose und Mannose bei 32° mit Preßhefe in drei Stunden vergären. Man füllt zweckmäßig als Kontrollen neben dem Röhrchen mit der Probe, ein weiteres mit der gleichen Menge Hefe und Wasser nebst 10–20 mg Glucose, um die Hefe auf Wirksamkeit zu prüfen, ein anderes mit Hefe und Wasser, um eine zufällige Verunreinigung der Hefe durch Zucker auszuschließen. — Die Röhrchen sind auch zur Erkennung von Galaktose neben Pentosen durch die sehr langsam vergärende Lactosehefe geeignet. Doch tritt bei längerer Dauer des Gärversuches leicht Infektion durch Fremdkerne ein, die das Ergebnis unsicher macht.

4. Für die quantitative Vergärung von Monosen empfiehlt A. J. KLUYVER<sup>2</sup> zunächst das LOHNSTEINSche „Präzisions-saccharimeter“ (Abb. 6), das auch nach den Versuchen von VAN DER HAAR auf seiner empirischen Skaleneinteilung, z. B. den Gehalt an Glucose, Fructose und Mannose ziemlich genau wiedergibt. So fand VAN DER HAAR:

|               | Glykose |       |      | Fructose | Mannose |
|---------------|---------|-------|------|----------|---------|
| zugesetzt mg: | 11,0    | 23,0  | 50,0 | 20,25    | 20,0    |
| gefunden mg:  | 10,5    | 23,25 | 49,5 | 20,5     | 18,5    |

Den Apparaten werden ausführliche Gebrauchsanweisungen beigegeben. Besonders zu achten ist auf eine sehr gute Einfettung des Stöpsels, um ein Entweichen von Gas dadurch auszuschließen. Auch empfiehlt es sich, den Apparat in einem besonderen Schutzglase in den Wärmeschrank zu bringen, um Schäden daran durch ausfließendes Quecksilber zu vermeiden.

Der Apparat ist auf den Luftdruck von 760 mm geeicht. Bei anderem Luftdruck ( $B$ ) wird der wirkliche Glucosegehalt  $p$  aus dem abgelesenen  $p_0$  nach folgender Formel berechnet:

$$p = p_0 \frac{B + 90}{850}.$$

<sup>1</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 85.

<sup>2</sup> A. J. KLUYVER: Biochem. Suikerbepalingen, Diss. Delft 1914.

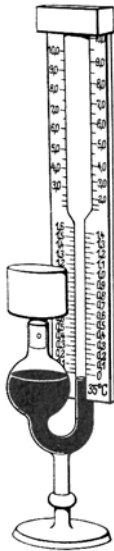


Abb. 6.  
Präzisions-  
saccharimeter  
nach  
LOHNSTEIN.

In dem Gärröhrchen werden bei 35° die genannten Hexosen mit etwa 100 mg Preßhefe<sup>1</sup> in 3—4 Stunden vergoren, während die langsam gärende Galaktose praktisch noch unverändert bleibt.

Für eine Vergärung der Galaktose, die etwa 60 Stunden erfordert, ist der LOHNSTEINSche Apparat weniger geeignet, weil er ein Arbeiten unter sterilen Bedingungen nicht gestattet. Hierfür haben G. VAN ITTERSON und KLUYVER den nebenstehenden Apparat<sup>2</sup> (Abb. 7) angegeben, der mit einer wahren Raumeinteilung versehen ist und ein Arbeiten mit Reinkulturen von Hefen ermöglicht.

Die Arbeitsweise ist folgende:

Nach keimdichtem Verschuß der beiden offenen Enden des U-Rohres mit einem Wattebausch wird der Apparat nach Schließen des Hahnes  $K_1$  zunächst bei 160° in einem Heizschränke sterilisiert. Dann gießt man durch den offenen Schenkel sterilisiertes Quecksilber, bis dessen Menge im U-Rohr etwas über den geöffneten Hahn  $K_2$  reicht. Man bringt nun 1—2 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit vorsichtig steril auf das Quecksilber über  $K_2$ . Darauf hält man den Apparat schräg und läßt das Quecksilber in dem rechten Schenkel so hoch steigen, bis die Oberfläche der Flüssigkeit etwas unter dem Wattebausch steht. Dann wird  $K_2$  geschlossen und mit Hilfe eines ausgeglühten dicken Platindrahtes vorsichtig eine am Draht haftende Menge Hefe aus einer Rohr-Reinkultur in der Flüssigkeit verteilt, wobei der Apparat, um eine Infektionsgefahr zu vermindern, wieder schräg gehalten wird. Wenn das geschehen ist, verschließt man das Rohr wieder mit dem Wattebausch und öffnet den Hahn  $K_2$ . Dann läßt man durch Hahn  $K_1$  soviel Quecksilber ausfließen, daß die mit der Hefe geimpfte Flüssigkeit teils unter, teils über  $K_2$  steht, worauf man durch Schrägstellung des Apparates den Meniskus des Quecksilbers genau auf den Teilstrich von 1 ccm bringt. Nun schließt man den Hahn  $K_2$  wieder, wobei man durch gute Einfettung für dessen luftdichten Verschuß sorgt. Dann läßt man aus Hahn  $K_1$  soviel Quecksilber ausfließen, daß die Oberfläche des Quecksilbers in dem Schenkel sehr niedrig steht und bringt den Apparat in einen Thermostaten von 30—35°. — Während der Gärung wird das Quecksilber durch zeitweiliges Ausfließenlassen durch den Hahn  $K_1$  niedrig gehalten. Ab und zu wird durch vorsichtiges Schütteln die Hefe in der Flüssigkeit verteilt und so deren Übersättigung mit Kohlensäure hintangehalten.

Nach beendeter Gärung (bei langsam vergärendem Zucker nach 48 Stunden) wird der Apparat eine halbe Stunde auf Zimmertemperatur gekühlt, dann soviel Quecksilber eingefüllt, daß dessen Höhe in beiden Schenkeln gleich ist, und Temperatur und Luftdruck abgelesen. Deren Berücksichtigung, bzw. Reduktion auf 0° und 760 mm erfolgt am einfachsten, indem man den abgelesenen Wert um soviel Prozente vermindert, wie die Tabelle 18 angibt.

Tabelle 18. Korrektionswerte in Prozent bei verschiedenen Temperaturen und Luftdruckablesungen.

| Temperatur<br>°C | Luftdruck in mm Quecksilber |     |     |     |     |     |
|------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                  | 730                         | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
| 11               | 7,7                         | 6,4 | 5,1 | 3,9 | 2,6 | 1,3 |
| 12               | 8,0                         | 6,7 | 5,4 | 4,2 | 2,9 | 1,7 |
| 13               | 8,3                         | 7,1 | 5,8 | 4,5 | 3,3 | 2,0 |
| 14               | 8,6                         | 7,4 | 6,1 | 4,9 | 3,6 | 2,4 |
| 15               | 8,9                         | 7,7 | 6,4 | 5,2 | 3,9 | 2,7 |
| 16               | 9,3                         | 8,0 | 6,8 | 5,5 | 4,3 | 3,0 |
| 17               | 9,6                         | 8,3 | 7,1 | 5,9 | 4,6 | 3,4 |
| 18               | 9,9                         | 8,6 | 7,4 | 6,2 | 4,9 | 3,7 |
| 19               | 10,2                        | 9,0 | 7,7 | 6,5 | 5,3 | 4,0 |
| 20               | 10,5                        | 9,3 | 8,0 | 6,8 | 5,6 | 4,4 |
| 21               | 10,8                        | 9,6 | 8,3 | 7,1 | 5,9 | 4,7 |
| 22               | 11,0                        | 9,8 | 8,6 | 7,4 | 6,2 | 4,9 |

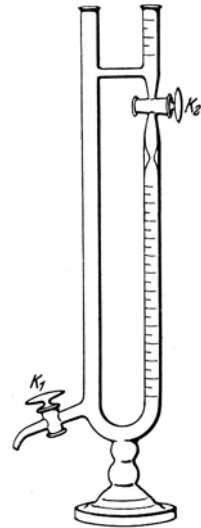


Abb. 7.  
Gärapparat nach  
VAN ITTERSON  
und KLUYVER.

<sup>1</sup> In der VAN DER HAAR etwa 1 mg vergärbaren Stoff fand, den man am besten durch einen blinden Versuch für sich ermittelt und abzieht. — Es ist stets frische einwandfreie Preßhefe zu verwenden.

<sup>2</sup> Zu beziehen von Warmbrunn, Quilitz & Co., Berlin. SO 36, Lausitzerstr. 10.

Von Hefen werden von KLUYVER Reinkulturen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula dattila* (Dattelhefe) und Lactosehefe empfohlen<sup>1</sup>, ferner auch gewöhnliche Hefe.

KLUYVER erhielt bei der Vergärung folgendes Verhältnis für Milligramm Hexose, die 1 ccm CO<sub>2</sub> bei 0° und 760 mm entsprachen:

|  | d-Glucose | d-Fructose | d-Mannose | d-Galaktose       |
|--|-----------|------------|-----------|-------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Preßhefe) | 4,0       | 4,1        | 4,0       | 4,3 in 60 Stunden |
| (Unterhefe)                                | 4,1       | 4,1        | 4,0       | 4,1 in 5 Tagen    |
| <i>Torula dattila</i> . . . . .            | 4,0       | 4,1        | 4,1       | keine Vergärung   |
| Lactosehefe . . . . .                      | 4,2       | 4,2        | 4,3       | 4,4               |
| Schizosach. Pombe . . . . .                | 4,2       | 4,2        | 4,2       | keine Vergärung.  |

Man kann auch die oben bereits erwähnte Tatsache benutzen, daß *Saccharomyces cerevisiae* und die Lactosehefe Glucose, Mannose und Fructose in 3 Stunden vergären und dabei die Galaktose praktisch unangegriffen lassen.

Vorteilhaft ist es, den Apparat nach VAN ITTERSON-KLUYVER in Verbindung mit dem von LOHNSTEIN nebeneinander zu benutzen (VAN DER HAAR), wobei man für den ersteren Lactosehefe, und für den anderen gewöhnliche Preßhefe verwendet.

E. SCHMIDT, F. TREFFZ und H. SCHNEGG<sup>2</sup> bestimmen die Galaktose neben Zymohexosen, indem sie zunächst bei  $p_{H} = 5,5$ , mittels Phosphatpuffer eingestellt, durch Löwenbräuhefe nach Ausschaltung der Selbstgärung die Summe der Zuckerarten durch 24stündige Gärung ermitteln. Darauf vergären sie bei  $p_{H} = 3,7$ , mit Acetatpuffer eingestellt, die Zymohexosen allein durch *Schizosaccharomyces Pombe*. Die Differenz ergibt die Galaktose.

### III. Nachweis und Bestimmung der Hexosane und Pentosane.

#### A. Nachweis und Bestimmung der Dextrine.

Unter den Stoffen, die gewöhnlich unter den Sammelbegriff „Dextrine“ zusammengefaßt werden, versteht man in der Regel die Zwischenglieder zwischen Stärke und Maltose bzw. Glucose, wie sie bei der Hydrolyse der Stärke mit Säuren gebildet werden. In analytischer Hinsicht unterscheiden sie sich von der Stärke dadurch, daß sie in Wasser weit stärker dispergiert sind und sich darin größtenteils zu einer echten, nicht kolloiden Lösung auflösen (vgl. bei Stärke S. 913), die sich bei Zusatz von Jodlösung nicht mehr blau, sondern braunrot bis braungelb färbt.

#### 1. Nachweis der Dextrine.

##### a) Alkoholfällung.

Zur Unterscheidung der Dextrine von den Zuckerarten dient ihre Eigenschaft durch Alkohol, den man in etwa 10facher Volummenge zusetzt, in Form einer milchigen, sich sehr langsam absetzenden Trübung auszuscheiden. Die Trübung besteht aus einer konzentrierteren wäßrigen, durch Alkohol dehydratisierten Dextrinlösung.

<sup>1</sup> Die Reinkulturen sind in Deutschland vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N 65, Seestr. 13, zu beziehen. — KLUYVER macht auch Angaben über die Selbstherstellung der Reinkulturen.

<sup>2</sup> E. SCHMIDT, F. TREFFZ u. H. SCHNEGG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1926, 59, 2635; Z. 1929, 58, 404.

Da nach J. FIEHE<sup>1</sup> die sog. „Honigdextrine“, Stoffe von noch nicht völlig aufgeklärter Zusammensetzung<sup>2</sup>, bei dieser „Alkoholprobe“ in Lösung bleiben, wenn man einige Tropfen Salzsäure zufügt<sup>3</sup>, ist es so möglich, die Stärkedextrine auch neben Honigdextrinen nachzuweisen. Bei dieser Probe dürfen natürlich andere, durch Alkohol fällbare Stoffe, nicht zugegen sein, also z. B. nicht Kolloide verschiedener Art und schwer lösliche Salze wie Phosphate, Sulfate, größere Mengen von Alkalichloriden usw. Aus Lebensmitteln erhaltene Lösungen bedürfen also bei der Probe einer Vorbehandlung, die FIEHE mit Ammoniumoxalat ausführt. Nach Versuchen von J. GROSSFELD und G. HOLLATZ<sup>4</sup> ist es aber ebenso zweckmäßig und einfacher, die zu prüfende Lösung zunächst mit Kaliumferrocyanid und Zinkacetat (S. 881) von den Kolloiden zu befreien und dann die Prüfung auszuführen. Hierbei ist es vorteilhaft, daß bei der Klärung von den Zusätzen nur Kaliumacetat und Zinkacetat zurückbleiben, die sich beide in Alkohol leicht lösen.

Bei dieser Arbeitsweise entstehen aus pektinhaltigen Stoffen (Fruchtzubereitungen) bisweilen noch leichte Trübungen, die vermutlich aus bei der Klärung nach CARREZ nicht völlig entfernten Pektinresten bestehen, die allerdings an ihrem flockigen, nicht milchigem Aussehen erkannt werden können. Diese Stoffe lassen sich mit Bleiessig entfernen und liefern ein Filtrat, das dann auf Dextrin geprüft wird. Man verfährt z. B. nach folgender Vorschrift:

50 ccm der zu untersuchenden Lösung werden mit 5 ccm Bleiessig versetzt und filtriert. Vom Filtrat werden 30 ccm mit 5 ccm Kaliumferrocyanidlösung (150 g im Liter) vermischt und nach 10—15 Minuten durch ein Faltenfilter aus Kieselgurfiltrierpapier filtriert. 25 ccm dieses so erhaltenen klaren Filtrates werden mit 2 Tropfen Essigsäure und 5 ccm Zinkacetatlösung (300 g im Liter) vermischt und nochmals filtriert. Dieses Filtrat wird mit Salzsäure und der 10fachen Menge 95%igem Alkohol versetzt und auf eintretende milchige Trübung hin beobachtet.

Ein ähnliches Verhalten wie bei Dextrin beobachteten GROSSFELD und HOLLATZ auch bei Gummiarabicum, das ebenfalls auch in der mit Kaliumferrocyanid und Zinkacetat geklärter Lösung eine starke Fällung lieferte, nicht dagegen Traganth. Ersteres kann also gegebenenfalls Dextrin vortäuschen.

### b) Jodreaktion.

Die mit Jod eintretende Braunfärbung der Stärkedextrine verwendet TH. v. FELLEBERG<sup>5</sup> zu ihrem Nachweis, z. B. in Honig. Bei der Ausführung des Versuches ist nur die Eigenfarbe des Jods durch geeignete Versuchsanstellung (Vergleichsversuch mit Wasser) zu berücksichtigen. v. FELLEBERG verfährt hierzu, wie folgt:

Man löst ungefähr 1 g Honig in einem Reagensglase in der Wärme in 5 ccm Wasser auf, kühlt ab und fügt 0,25 ccm 0,1 N.-Jodlösung hinzu. In ein gleich weites Reagensglas bringt man 5 ccm Wasser und 0,25 ccm Jodlösung. Echte Honige geben eine gelbbraune Färbung von derselben Farbtiefe wie der blinde Versuch, stärkedextrinhaltige eine mehr oder weniger deutliche, oft äußerst intensive Bräunung. Bei Reihenuntersuchungen stechen die dextrinhaltigen Proben sofort hervor.

In positiven oder in zweifelhaften Fällen wiederholt man die Probe, indem man diesmal 2 g Honig in ein Reagensglas wägt, in 9 ccm Wasser unter Erwärmen im Wasserbade löst, zu der heißen Lösung 1 ccm Phosphormolybdänsäurelösung<sup>6</sup> zusetzt und filtriert. Das klare Filtrat wird gekühlt und 5 ccm davon werden mit Jodlösung geprüft. Die Farbunterschiede treten hier noch deutlicher hervor als bei den eiweißhaltigen Lösungen.

Diese Jodreaktion hat den Vorteil, daß sie durch Gegenwart alkoholunlöslicher Salze nicht — wie die Alkoholprobe — gestört wird. Auch ist sie als noch mehr spezifisch zu deren Kontrolle besonders geeignet.

Über Darstellung und Reinigung von Dextrin aus Naturhonig vgl. v. FELLEBERG<sup>7</sup>.

<sup>1</sup> J. FIEHE: Z. 1909, 18, 30.

<sup>2</sup> Vgl. J. FIEHE und W. KORDATZKI: Z. 1928, 55, 602.

<sup>3</sup> Wodurch wahrscheinlich salzartige, in Alkohol schwer lösliche Verbindungen der Honigdextrine in die freien leichter löslichen umgewandelt werden.

<sup>4</sup> J. GROSSFELD u. G. HOLLATZ: Z. 1930, 59, 216.

<sup>5</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1928, 19, 49.

<sup>6</sup> Zur Bereitung der Phosphormolybdänsäurelösung löst man 5 g Phosphormolybdänsäure und 15 g konz. Schwefelsäure zum Liter auf.

<sup>7</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1933, 24, 370.

## 2. Bestimmung der Dextrine.

### a) Alkoholverfahren.

#### a) Trennung der Dextrine und Zucker.

Das einfachste Verfahren zur Trennung der Dextrine von den (alkohollöslichen) Zuckerarten besteht in der Ausfällung der Dextrine durch Alkohol, während die Zuckerarten in Lösung bleiben. Nach F. LUCIUS<sup>1</sup> wird die Löslichkeit der Zuckerarten bei der Fällung mit Alkohol (und Äther) stark durch den Gehalt an Fructose begünstigt.

Zur Ausführung der Trennung dampft man die wäßrige Lösung in einer Glasschale auf dem Wasserbade bis zum dicken Sirup ein, löst diesen in 10 oder 20 ccm warmem Wasser und versetzt die Lösung unter fortwährendem Umrühren allmählich mit 100 bzw. 200 ccm Alkohol von 95 Vol.-%. Nachdem sich der entstandene Niederschlag, welcher die Dextrine<sup>2</sup> enthält, abgesetzt hat, filtriert man die fast klare alkoholische Lösung in eine Porzellanschale ab und wäscht den Rückstand in der ersten Schale unter Reiben mit einem Pistill mehrmals mit kleinen Mengen Alkohol (hergestellt durch Vermischen von 1 Teil Wasser mit 10 Teilen Alkohol von 95 Vol.-% aus. Das Filtrat wird zur Vertreibung des Alkohols vorsichtig auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand abermals mit 10 ccm Wasser gelöst und in derselben Weise nochmals mit Alkohol behandelt. Ebenso werden die abgeschiedenen Dextrine wieder mit heißem Wasser von dem Filter in die Schale gelöst, auf 10–20 ccm eingedampft und nochmals wie oben gefällt.

Unter Umständen erhält man eine bessere flockige Abscheidung der Dextrine, wenn man erst  $\frac{1}{5}$ – $\frac{1}{4}$  des nötigen Äthylalkohols an Methylalkohol zusetzt, z. B. die Zucker-Dextrinlösung (20 ccm) erst mit 40 ccm Methylalkohol und darauf mit 150–160 ccm Äthylalkohol vermischt.

Die alkoholischen Filtrate, welche die Zuckerarten enthalten, werden zur Trockne verdampft, mit Wasser aufgenommen und behufs Bestimmung und Trennung der Zuckerarten auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Die Alkohol-fällung auf dem Filter und in den Schalen enthält die Dextrine. Man löst sie in heißem Wasser und bestimmt die Dextrine, entweder polarimetrisch (S. 876) oder nach Hydrolyse mit Salzsäure als Glucose (S. 860 u. folg.).

Zu diesem Trennungsverfahren muß ausdrücklich bemerkt werden, daß es als ein genaues nicht angesehen werden kann; denn einerseits wird durch den zuckerhaltigen Alkohol stets etwas Dextrin in Lösung gehalten, andererseits schließt abgeschiedene konzentrierte Dextrinlösung, aus der ja wie oben erwähnt, die Fällung besteht, stets auch etwas Zucker, besonders in Alkohol schwerlösliche Maltose und unlösliche Lactose, die sich sogar unter Umständen krystallinisch dabei abscheiden können, mit ein.

#### β) Bestimmung der Dextrine.

Der einfachste Weg, die Dextrine in Lösung zu bestimmen, besteht — ähnlich wie beim Nachweis der Dextrine — darin, daß man sie aus einer auf geeignete Weise (z. B. mit Zinkferrocyanid) geklärten Lösung mit Alkohol in Gegenwart von Salzsäure ausfällt und nach Trocknung zur Wägung bringt. Für die Dextrine des Stärkesirups beobachteten J. GROSSFELD und F. HOLLATZ<sup>3</sup> bei dieser Alkohol-fällung gewisse Gesetzmäßigkeiten, wenn nach folgender Vorschrift verfahren wurde.

20 g Stärkesirup werden in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 10 ccm in einem 50 ccm-Kölbehen durch Zusatz von

<sup>1</sup> F. LUCIUS: Z. 1927, 53, 376.

<sup>2</sup> Enthält die Lösung Stärke und Proteine, so finden sich diese ebenfalls in der Alkohol-fällung.

<sup>3</sup> J. GROSSFELD u. F. HOLLATZ: Z. 1930, 59, 216.

je 0,5 ccm Kaliumferrocyanidlösung (150 g des krystallisierten Salzes im Liter) und Zinkacetatlösung (230 g des krystallisierten Salzes im Liter) unter jedesmaligem Umschütteln geklärt, so daß das Gesamtvolumen der Mischung 11 ccm beträgt. Dann wird filtriert. Vom Filtrat werden 5 ccm in einen gewogenen 100 ccm ERLÉNMEYER-Kolben gegeben, 0,5 ccm konz. Salzsäure (D. 1,19) zugegeben und 50 ccm 95 vol.-%iger Alkohol<sup>1</sup> zugefügt, worauf bei Gegenwart von Stärkesirup eine milchige Trübung entsteht. Das Gemisch bleibt nach Verschuß des Kolbens mit einem Korkstopfen bis zum folgenden Tage oder länger stehen, wobei sich die Ausscheidung als zähe Masse unter Klärung der darüberstehenden Flüssigkeit am Kolbenboden ausscheidet<sup>2</sup>. Hiervon wird abgossen, mit 95 %igem Alkohol abgespült und der Kolben im Trockenschranke bei 110° eine Stunde getrocknet. Nach dem Erkalten wird das ausgeschiedene Dextrin gewogen.

Zur Umrechnung auf Prozente des angewendeten Stoffes ist entsprechend der Verdünnung die gewogene Menge Dextrin in g mit dem Faktor 110 malzunehmen.

Wurden mit Stärkesiruplösungen verschiedener Konzentrationen die gewogenen Dextrinmengen ( $x$ ) als Ordinaten, die Stärkesirupkonzentrationen in Prozenten ( $y$ ) als Abszissen gezeichnet, so entstanden Kurven, denen, wie gezeigt werden konnte, die Funktion  $y = ax^n$  zugrunde liegt. Dabei sind  $a$  (Dextrinfaktor) und  $n$  (Dextrinexponent) charakteristische Kennzahlen eines Stärkesirups, bezüglich deren Berechnung hier auf die Originalstelle verwiesen sei. Bei 10 Stärkesirupproben war der Exponent  $n$  geringeren Schwankungen als der Faktor  $a$  ausgesetzt. Im Mittel betragen

$$a = 2,50 \quad n = 0,67 \text{ (bzw. } \frac{2}{3}\text{)},$$

woraus sich die mittlere Beziehung ergab:

$$y = 2,50 x^{2/3} \quad y = 2,50 \sqrt[3]{x^2}.$$

Diese Gleichung, der die Kurve in Abb. 8 entspricht, ermöglicht die Berechnung des ungefähren Stärkesirup- (bzw. Dextrin-) Gehaltes<sup>3</sup> aus dem gewogenen Dextrin, wobei man sich aber immer bewußt bleiben muß, daß nicht jeder Stärkesirup diesen mittleren Werten von  $a$  und  $n$  entspricht.

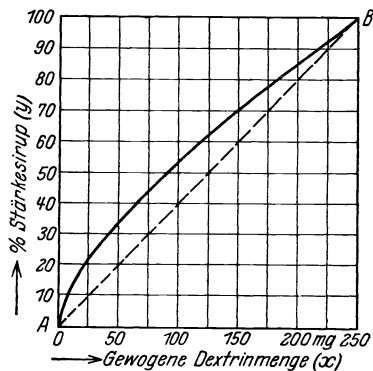


Abb. 8. Dextrinkurve von Stärkesirup.

### b) Gärverfahren.

Zur Vergärung aller Zuckerarten neben Dextrin eignet sich nach den Versuchen von P. HÖRMANN und J. KÖNIG<sup>4</sup> die Hefe aus Danziger Jopenbier am besten, über die Arbeitsweise vgl. S. 904.

Das abgeschiedene Dextrin wird dann zweckmäßig entweder polarimetrisch nach S. 876 oder nach Hydrolyse mit Salzsäure (vgl. S. 860 u. folg.) als Glucose bestimmt.

Zur Ausführung dieser Hydrolyse löst man nach TH. v. FELLEBERG<sup>5</sup> das Dextrin in etwa 75 ccm N.-Salzsäure, führt in ein 100 ccm-Meßkölbchen über und erhitzt eine Stunde im kochenden Wasserbade. Nach Erkalten neutralisiert man fast vollständig mit starker Natronlauge gegen Methylorange und füllt zur Marke auf. — Diese auch von I. M. KOLTHOFF<sup>6</sup> empfohlene

<sup>1</sup> Absoluter Alkohol liefert etwa 50% stärkere Fällungen.

<sup>2</sup> Falls sich der Niederschlag schlecht absetzte, gelang es gewöhnlich durch Erwärmen auf dem Wasserbade, für einige Minuten einen gut haftenden Bodensatz zu erhalten.

<sup>3</sup> Da Stärkesirup etwa 40% Dextrin enthält, ist die Dextrinmenge = 0,4mal Stärkesirupmenge.

<sup>4</sup> P. HÖRMANN u. J. KÖNIG: Z. 1907, 13, 113.

<sup>5</sup> Nach KOLTHOFF: Z. 1923, 45, 146.

<sup>6</sup> I. M. KOLTHOFF: Z. 1923, 45, 145.



Behandlung führt, wie auch J. GROSSFELD und G. HOLLATZ<sup>1</sup>, sowie C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>2</sup> bestätigen, zu einer vollständigen Hydrolyse des Dextrins (vgl. auch die Vorschrift von KRUISHEER S. 897).

Im Gegensatz hierzu empfehlen ältere Vorschriften, sowie neuerdings A. P. SCHULZ und G. STEINHOFF<sup>3</sup>, wieder ein dreistündiges Erhitzen, um alles Dextrin zu verzuckern. Noch langsamer verzuckert nach diesen verdünnte Schwefelsäure, die aber, wie eigene Versuche bestätigen, auch weniger Reversionsprodukte erzeugt.

Die Glucosebestimmung in der Lösung erfolgt am besten jodometrisch nach S. 890, weil hierbei etwa aus Fructosanen (Inulin) entstandene Fructose nicht stört. Die gefundene Glucose, mal 0,90, würde theoretisch die entsprechende Dextrinmenge ergeben, doch fand C. J. KRUISHEER<sup>4</sup>, daß man durch Multiplikation mit 1,00 (aus noch nicht ganz geklärten) Gründen besser stimmende Ergebnisse erhält.

Als praktisch besonders brauchbar erscheint ein Vorschlag von W. R. FETZER, J. W. EVANS und J. B. LONGENECKER<sup>5</sup> den Dextringehalt aus der Drehungsabnahme mit Malzauszug abzuleiten. Nach ihren Versuchen geht damit die Drehung von 1 g Dextrin in 100 ccm von 3,92° auf 2,92°, also um 1,00° zurück. Dabei wird das Dextrin zu über 98% umgewandelt. Zur Ausführung der Bestimmung werden z. B. 25 g Maissirup mit 50 ccm Malzauszug<sup>6</sup> und 10 ccm Wasser 8 Stunden bei 62,8—64,4° verzuckert. Die Lösung wird dann polarisiert und der Einfluß des Malzauszuges durch Blindversuch abgezogen.

### c) Dextrinbestimmung nach Zerstörung der Zuckerarten mit Alkalien.

A. F. VOLLANT<sup>7</sup> invertiert zunächst die Saccharose mit Salzsäure (vgl. S. 886), zerstört die reduzierenden Zuckerarten nach LEMELAND (S. 884) durch alkalische Wasserstoffsperoxydlösung und polarisiert, wobei das nicht veränderte Dextrin sich durch Rechtsdrehung zu erkennen gibt. — Vorhandene Eiweißstoffe entfernt VOLLANT vorher mit Natriummetaphosphat und Salzsäure, Gummi durch Eisenchlorid in alkalischer Lösung oder nach BELLIER mit Calciumchlorid und Alkohol. — Vielleicht ist auch zur Dextrinbestimmung neben Zuckerarten eine entsprechende Abänderung des Kalkverfahrens von BEHRE (S. 884) geeignet, was aber noch einer näheren Prüfung bedarf.

### d) Über Bestimmung von Dextrin bzw. Stärkesirup

neben Saccharose und Invertzucker durch Ermittlung der spezifischen Drehung des invertierten Extraktes (Zuckers) nach A. JUCKENACK vgl. Bd. V bei Fruchtzubereitungen.

## B. Nachweis und Bestimmung der Stärke.

Als Stärke bezeichnen wir ein bestimmtes, in pflanzlichen Lebensmitteln weit verbreitetes Kohlenhydrat, das in kaltem Wasser unlöslich ist, beim Erhitzen mit Wasser aber stark aufquillt, eine kolloide Lösung bildet (Stärkekleister), sich mit Jod stark blau färbt und durch Kochen mit Säuren oder unter der Einwirkung von Diastase über Dextrin, Maltose (Isomaltose) in Glucose übergeht.

Lebensmittel tierischer Herkunft enthalten keine Stärke, dafür aber kleinere oder größere Mengen Glykogen, das vor allem in der Leber gespeichert wird. Das Glykogen stimmt in vielen Eigenschaften mit der Stärke überein. Es kann durch alkoholische Kalilauge ähnlich wie Stärke aus den tierischen Organen isoliert werden, dreht die Ebene des polarisierten Lichtes praktisch in gleichem

<sup>1</sup> J. GROSSFELD u. G. HOLLATZ: *Z.* 1930, 59, 233.

<sup>2</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: *Apoth.-Ztg.* 1930, 45, 1566.

<sup>3</sup> A. P. SCHULZ u. G. STEINHOFF: *Zeitschr. Spiritusind.* 1933, 56, 63.

<sup>4</sup> C. J. KRUISHEER: *Z.* 1929, 58, 266.

<sup>5</sup> W. R. FETZER, J. W. EVANS u. J. B. LONGENECKER: *Ind. Engin. Chem., Analyt. Edit.* 1933, 5, 81.

<sup>6</sup> Nach besonderer Vorschrift werden 187,5 g Malz ausgezogen und der Auszug auf 250 ccm gebracht. — Es dürfte sich empfehlen, die Wirksamkeit des Malzes bzw. Malzauszuges an einer Sirupprobe von bekanntem Dextringehalt besonders zu prüfen.

<sup>7</sup> A. F. VOLLANT: *Ann. Falsif.* 1911, 4, 504; *Z.* 1913, 25, 162.

Grade nach rechts und ist auch durch Hydrolyse in Glucose überführbar. Von der Stärke unterscheidet es sich durch seine größere Löslichkeit und die Eigenschaft mit Jodlösung sich nicht blau sondern weinrot zu färben.

In dieser Hinsicht steht das Glykogen den Dextrinen näher, kann aber seinerseits bei der Hydrolyse mit Mineralsäuren verschiedene Dextrine bilden. Diastatische Enzyme führen das Glykogen je nach der Natur des Enzyms in Maltose oder Glucose über.

Verschieden von Glykogen ist das Hefegummi, das bei der Hydrolyse neben Glucose auch Mannose liefert (vgl. S. 962).

## 1. Nachweis der Stärke.

Auf obigem Begriff der Stärke beruht ihr Nachweis neben anderen Kohlenhydraten. Vor allem ist ihre Blaufärbung mit wäßriger Jodlösung charakteristisch, die auch bei Stärkekleister in gleicher Deutlichkeit eintritt.

Die Aufquellung der Stärke, die sog. Verkleisterung, erfolgt plötzlich, je nach Stärkeart bei verschiedenen, ziemlich charakteristischen Temperaturen, und beginnt nach LIPPMANN deutlich bei etwa 50° (Roggenstärke) bis 77° (Eichelstärke), wobei man vorher bereits ein Aufquellen der Körnchen bemerkt.

Verkleisterungstheorie nach J. A. VAN DER HOEVE, H. G. BUNGENBERG DE JONG und H. R. KRUYT<sup>1</sup>: Die Mizellen im Verbands des Stärkekorns enthalten weniger Hydrationswasser, als dieselben Mizellen im freien Zustande besitzen würden. Werden die Körner in Wasser gebracht, so suchen die Mizellen ihren Wassermangel auszufüllen; durch ihre Haftung aneinander (mit den hydrophoben Stellen) wird dieses Bedürfnis Wasser aufzunehmen aber nahezu völlig unterdrückt. Wird nun durch einen oder anderen Einfluß, sei es durch Temperaturerhöhung, sei es durch Adsorption von Chemikalien der Widerstand der Kittstellen geschwächt, so wird in einem bestimmten Augenblick der Kornzusammenhang nicht mehr imstande sein, die Hydratation der Mizellen zu überwinden. Die Mizellen nehmen das Hydrationswasser auf unter Quellung, unter Veränderung des Röntgenogramms, unter Verlust der Doppelbrechung und unter Zerstörung des Kornzusammenhangs. Die Mizellen kommen anders (weniger eng gepackt) gegeneinander zu liegen, es entstehen intermizellare Räume, die mit dem Außenwasser gefüllt werden. Einzelne Mizellen sinken aus dem Gelverband heraus und verteilen sich in der Außenflüssigkeit. Das Korn quillt gewaltig und die Außenflüssigkeit wird ein sehr verdünntes Stärkesol.

Neben der Stärke befinden sich in Pflanzenstoffen aber auch besonders nach den Untersuchungen von J. KÖNIG und R. GROSSMANN<sup>2</sup>, C. J. LINTNER<sup>3</sup>, J. KÖNIG und W. SUTTHOFF<sup>4</sup> andere Kohlenhydrate, die ebenfalls Zucker, neben Pentosen auch Hexosen liefern, die sog. Hemicellulosen, die zusammen mit der Stärke auch unter den Sammelbegriff „In Zucker überführbare Stoffe“ zusammengefaßt und in der Hauptsache in Hexosane, zu denen aber auch die Stärke gehört, und Pentosane geschieden werden. Hauptsächlich werden diese Begleitstoffe in den jungen Zellwänden ihren Sitz haben. Diese Stoffe sind es vorwiegend, die die Genauigkeit der Stärkebestimmung beeinträchtigen.

## 2. Bestimmung der Stärke<sup>5</sup>.

### a) Bestimmung der Stärke durch direkte Abscheidung.

α) Verfahren von J. MAYRHOFER. Besonders zur Bestimmung der Stärke in Wurstwaren hat J. MAYRHOFER<sup>6</sup> ein Verfahren angegeben, das aber auch

<sup>1</sup> Privatmitteilung.

<sup>2</sup> J. KÖNIG u. R. GROSSMANN: Landw. Vers.-Stationen 1897, 48, 81.

<sup>3</sup> C. J. LINTNER: Zeitschr. angew. Chem. 1898, 725.

<sup>4</sup> J. KÖNIG u. W. SUTTHOFF: Landw. Vers.-Stationen 1909, 70, 343.

<sup>5</sup> Wegen der Unvollkommenheit vieler Stärkebestimmungsverfahren bezüglich der Abscheidung der Hexosane und Pentosane ist bei Stärkegehaltbestimmungen stets das Bestimmungsverfahren mit anzugeben.

<sup>6</sup> J. MAYRHOFER: Z. 1901, 4, 1101.

für andere, insbesondere eiweißreiche Nahrungsmittel verschiedentlich verwendet worden ist. Es beruht darauf, daß die zu prüfende Substanz solange mit heißer 8%iger alkoholischer Kalilauge behandelt wird, bis die vorhandenen Proteinstoffe (durch Umwandlung in Albumosen und Peptone) und der Fette (durch Verseifung) in Lösung gegangen sind, und die gegebenenfalls vorhandene Stärke (als Kaliumverbindung) in Form einer krümeligen Masse zurückgeblieben ist. Man verdünnt sodann mit heißem 50%igen Alkohol, läßt absitzen und filtriert (Asbeströhrchen sind Papierfiltern vorzuziehen), wäscht noch zweimal mit heißer alkoholischer Kalilauge und schließlich mit Alkohol nach, bis das Filtrat auf Zusatz von Säure vollkommen klar bleibt und nicht mehr alkalisch reagiert.

Nunmehr gibt man das Filter in das ursprüngliche Gefäß zurück und erwärmt mit etwa 60 ccm wäßriger N.-Kalilauge auf dem Wasserbade eine halbe Stunde lang unter öfterem Umschütteln. Bei sehr mehrlreichen Stoffen wendet man etwas stärkere Lauge an, um eine vollkommene Lösung zu erzielen. Nach

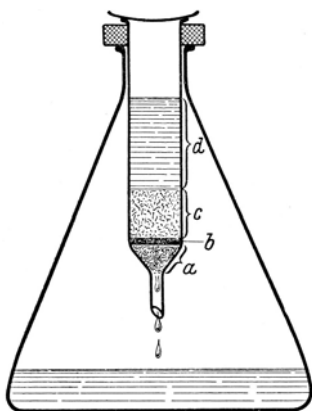


Abb. 9. Filtervorrichtung für Stärke nach GROSSFELD.

dem Erkalten säuert man mit Essigsäure an und bringt zweckmäßig das Volumen der Flüssigkeit auf 400 ccm, wobei man den durch das Filter veranlaßten Fehler vernachlässigt; man filtriert und fällt in einem aliquoten Teil der Lösung die Stärke mit Alkohol aus. Der Niederschlag wird auf gewogenem Filter gesammelt, mit 50%igen Alkohol solange gewaschen, bis das Filter beim Verdampfen auf einem Uhrgläschen keinen Rückstand mehr hinterläßt. Sodann verdrängt man den verdünnten Alkohol mit absolutem, diesen endlich mit Äther und trocknet erst bei 50–60° vor, um eine Verkleisterung der Stärke zu vermeiden, dann bei 100° bis zur Gewichtsbeständigkeit.

Der erste Teil dieses Verfahrens von MAYRHOFER ist besonders geeignet, kleinere Mengen von Stärke neben viel Eiweißstoffen und Fett anzureichern. Die Filtration des Stärkekaliums und

dessen Auswaschung mit Alkohol wird dabei nach Versuchen von J. GROSSFELD<sup>1</sup> in der Siedehitze außerordentlich beschleunigt, wobei man sich zweckmäßig der nachfolgend beschriebenen Filtervorrichtung bedient, und ausschließlich mit etwa 90%igem Alkohol auswäscht.

Zur Herstellung des Filters (Abb. 9) wird in ein Filterröhrchen entweder ein passendes Siebplättchen oder auch ein Bausch Glaswolle (a)<sup>2</sup> gesteckt, mit einem Glasstabe angedrückt und darüber eine Schicht Asbest oder auch Zellstoff (b) mit Hilfe der Saugpumpe angebracht. Dieses Röhrchen wird alsdann in einen breiten durchbohrten Korkstopfen gesteckt und in einen genügend weithalsigen ERLÉNMEYER-Kolben gehängt. Nach Einfüllung der mit alkoholischer Kalilauge aufgeschlossenen Substanz setzt sich die Stärke (c) meist rasch ab und ist als gelbliche Schicht von der überstehenden braunen Flüssigkeit (d) leicht zu unterscheiden. Zur Vermeidung von Alkoholverdunstung wird das Röhrchen mit einem Uhrglase bedeckt. — Nach Aufstellen der Filtervorrichtung auf ein heißes Wasserbad, so daß das Filtrat leicht siedet, läßt man die Flüssigkeit möglichst vollständig durchtropfen und gibt alsdann so oft frischen Alkohol nach, bis die Tropfen an der unteren Spitze des Röhrchens farblos werden. Abgesehen von dem Nachgießen bedarf die Vorrichtung keiner besonderen Wartung.

Nicht zu empfehlen ist dagegen die von MAYRHOFER vorgeschlagene Weiterverarbeitung des in der alkoholischen Kalilauge unlöslich gebliebenen Stärke-

<sup>1</sup> J. GROSSFELD: Z. 1921, 42, 29.

<sup>2</sup> Auch Röhrchen mit Glasfiltern von Schott & Gen. mit der Porenweite 2 oder 3 sind für den Zweck geeignet, z. B. Form 6b G2, oder ähnliche.

rückstandes durch Lösen in wäßriger Kalilauge und Ausfällen mit Alkohol bei Gegenwart von Essigsäure, weil nicht nur der so entstehende Niederschlag schwierig filtrierbar ist sondern auch bedeutende Mengen nicht stärkeartiger Kohlenhydrate einschließt. Der dadurch entstehende Fehler macht sich besonders bei Vorliegen größerer Mengen solcher, z. B. in Kleien, Pflanzensamen usw. bemerkbar.

Auch die von MAYRHOFER angestrebte vollständige Trennung der Stärke von Glykogen erscheint bei der großen Ähnlichkeit beider Stoffe in analytischer Hinsicht auf diese Weise wenig erfolversprechend.

Eine Verbesserung des MAYRHOFERSchen Verfahrens wurde von G. BAUMERT und H. BODE<sup>1</sup> für Kartoffeln angegeben und von H. WITTE<sup>2</sup> dann weiter für die Bestimmung der Stärke in Mehlen und Stärkemehlen ausgebildet. Bei diesem Verfahren wird die Stärke zunächst im Dampftopf aufgeschlossen. BAUMERT<sup>3</sup> hat dann aber später diese Behandlung im Dampftopf durch Aufschließen mit Salzsäure nach LINTNER (S. 919) ersetzt und verfährt nun, wie folgt:

3 g der feinstgepulverten Substanz werden in einem Becherglase mit 2—5 ccm Wasser gleichmäßig verrieben und unter fortgesetztem Umrühren und Abkühlen (durch Einstellen in kaltes Wasser) mit 10 ccm Salzsäure (D. 1,19) versetzt.

Nachdem in längstens 10 Minuten die gequollene Masse dünnflüssig geworden ist, fügt man unter fortgesetztem Rühren und guter Kühlung Natronlauge (20%ig) im Überschuß hinzu, spült den Inhalt des Becherglases mit Wasser in ein 250 ccm-Kölbchen, füllt unter Umschütteln zur Marke auf und filtriert nach dem Absitzen durch ein Faltenfilter.

25 ccm des Filtrates werden nach Zugabe von etwa 1 g feinflockigem Asbest unter kräftigem Umrühren mit 50—60 ccm Alkohol (von 94—96%) gefällt. Sobald der Niederschlag sich klar abgesetzt hat, sammelt man ihn unter Benutzung der Wasserluftpumpe in einem vorher ausgeglühten Asbestfiltrerröhrchen, wäscht ihn mit Alkohol unter Zusatz von 3—5 ccm verd. Salzsäure (zur Zersetzung des Stärkenatriums), darauf mit 80%igen und dann mit absolutem Alkohol und zuletzt mit Äther aus.

Nachdem das Röhrchen getrocknet und gewogen ist, wird der Inhalt im Sauerstoffstrom geblüht, und nach dem Erkalten das Röhrchen zurückgewogen. Der Gewichtsverlust wird als Stärke in Rechnung gestellt.

Dieses Verfahren eignet sich nach G. BAUMERT gleichmäßig gut für die Bestimmung der Stärke in Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Reis und Mais.

A. HUIZINGA<sup>4</sup> erhielt nach dem Verfahren von BAUMERT und BODE bei Kartoffeln Differenzen bis zu 1,2%, die er auf verschiedene starke Einwirkung der Hitze im Dampftopf auf die Stärke zurückführt, und zieht daher eine 15 Minuten lange Verkleisterung im kochenden Wasserbade vor.

**β) Verfahren von RASK.** Eine durch Einfachheit ausgezeichnete Schnellmethode zur Bestimmung von Stärke, die dabei in Salzsäure gelöst, mit Alkohol gefällt, abfiltriert und gewogen wird, gibt O. S. RASK<sup>5</sup> an. Sie wird, wie folgt, ausgeführt:

1—4 g der feingepulverten Probe werden auf dem Filter nacheinander mit Äther, 10%igem Alkohol und Wasser ausgezogen, der Rückstand mitsamt Filter im 50 ccm-Becherglase nach Zusatz von 10—11 Tropfen kalter 20%iger Salzsäure zur Paste verrieben, 20—25 ccm Salzsäure zugegeben, fein zerteilt, in einen 100 ccm-Kolben übergespült, aufgefüllt und durch einen GOOCH-Tiegel filtriert. 50 ccm des Filtrates werden im 200 ccm-Becherglase in 110—115 ccm 96%igen Alkohol eingerührt, der Niederschlag durch einen GOOCH-Tiegel abfiltriert, erst mit 70%igem, dann mit 96%igem Alkohol bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, schließlich mit Äther ausgewaschen, eine Stunde bei 130° getrocknet, 20—30 Minuten abgekühlt und gewogen.

<sup>1</sup> G. BAUMERT u. H. BODE: Zeitschr. angew. Chem. 1900, 1074, 1111; 1901, 461.

<sup>2</sup> H. WITTE: Z. 1904, 7, 65.

<sup>3</sup> BAUMERT: Z. 1909, 18, 167.

<sup>4</sup> A. HUIZINGA: Chem. Weekbl. 1916, 13, 198—205; Z. 1925, 45, 295.

<sup>5</sup> O. S. RASK: Journ. Assoc. agricult. Chem. 1927, 10, 108—120; C. 1927, II, 1408.

C. W. HERD und D. W. KENT JONES<sup>1</sup> verglichen dieses Verfahren von RASK mit der Stärkebestimmung mittels Malz- oder Gerstendiastase und fanden z. B. an Stärke:

Tabelle 19.

| Gegenstand                              | Bestimmung mit |                  | Verfahren von RASK |
|---|----------------|------------------|--------------------|
|   | Malz-Diastase  | Gersten-Diastase |                    |
| Weizenstärke mit 85,05% . .             | —              | —                | —                  |
| Reinstärke <sup>2</sup> . . . . .       | 77,7           | 75,0             | 83,9               |
| Dgl. mit 83,40% Reinstärke <sup>2</sup> | 77,5           | 77,1             | 83,0               |
| Auszugsmehl . . . . .                   | 73,6           | 73,2             | 70,6               |
| Bäckermehl . . . . .                    | 67,1           | 65,3             | 65,0               |
| Nachmehl (Sharp) . . . . .              | 20,2           | 19,7             | 16,6               |
| Kleie . . . . .                         | 11,0           | 13,5             | 5,8                |
| Bollmehl . . . . .                      | 52,2           | 50,2             | 51,5               |

Das Verfahren von RASK scheint hiernach bessere Ergebnisse als das Diastaseverfahren zu liefern. — Dagegen wird es von E. H. HALL<sup>3</sup> als ungünstig und zur Kontrolle ungeeignet beurteilt.

γ) Verfahren von von FELLEBERG. Eine außerordentlich genaue Bestimmung der Stärke ermöglichen ihre Eigenschaften, sich in konz. Calciumchloridlösung zu lösen

und daraus durch Jod-Jodkalium quantitativ wieder gefällt zu werden.

Nachdem bereits A. KAISER<sup>4</sup> die Fällung verkleisterter Stärke mit Jod aus wäßriger Lösung bei Gegenwart von Natriumacetat angewandt hatte, schlug TH. v. FELLEBERG<sup>5</sup> zuerst die Ausfällung aus Calciumchloridlösung vor. Nach v. FELLEBERG werden außer der Stärke keine anderen Körper durch Jod gefällt, also weder Pektin, Inulin noch Dextrin, Glykogen und Pentosane. Die so erzielbaren Ergebnisse müssen daher außerordentlich genau sein. Dabei kann die Stärke nach ihrer Abscheidung als solche gewogen, aber auch nach verschiedenen indirekten Verfahren bestimmt werden.

Bei seiner ersten Vorschrift führte v. FELLEBERG die erforderlichen Trennungen von Niederschlag und Lösung durch Filtration aus und brachte die Stärke schließlich als solche zur Wägung.

Je nach dem erwarteten Stärkegehalt werden 0,3—1 g des im Achatmörser möglichst fein gemahlten Produktes (bei Wurst etwa 5 g einer zerriebenen Durchschnittsprobe bei schwer pulverisierbaren Materialien nach Beuteln durch Seidengaze, Gewürze und fettreiche Lebensmittel nach Ausziehen mit siedendem Alkohol<sup>6</sup> und Äther und Trocknen im Trockenschrank) in ein 100 ccm fassendes ERLÉNMEYER-Kölbchen gebracht, mit etwas Wasser eben benetzt, mit 20 ccm einer Lösung gleicher Gewichtsteile von geglühtem Calciumchlorid und Wasser versetzt und  $\frac{1}{2}$  Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt, wobei man gelegentlich mit einem Glasstabe umrührt. Alsdann faßt man das Kölbchen mit einem Reagensglashalter, kocht auf und hält die Lösung 5 Minuten lang in schwachem Sieden. Dabei schiebt man von Zeit zu Zeit die an den Wandungen hängenden Teilchen mit dem Glasstabe hinunter und zerdrückt etwa vorhandene Knöllchen. Nach dem Abkühlen spült man den Kolbeninhalt in ein 100 ccm-Maßkölbchen, füllt zur Marke auf, filtriert zunächst durch einen Wattebausch und darauf durch trockenen Asbest in einem GOOCH-Tiegel, den man mit einem Teil der Lösung aufgeschwemmt hat. Sollte das Filtrat noch nicht ganz klar sein, so zentrifugiert man es während einiger Minuten.

50—75 ccm des zwar opaleszierenden, in der Durchsicht aber klaren Filtrates werden nun mit 0,02 N.-Jodlösung versetzt, bis eine blauschwarze, flockige Fällung von Jodstärke entstanden ist. Ein allzu großer Überschuß an Jod ist zu vermeiden. Bei ganz geringen Gehalten, etwa bei 1% und darunter, färbt

<sup>1</sup> C. W. HERD and D. W. KENT JONES: Journ. Soc. chem. Ind. 1931, 50, T. 15—22.

<sup>2</sup> Berechnet aus der Differenz: 100 — (Wasser + Protein + Fett + Zucker + Asche).

<sup>3</sup> E. H. HALL: Journ. Soc. chem. Ind. 1931, 50, T. 429.

<sup>4</sup> A. KAISER: Chem.-Ztg. 1902, 26, 180. Vgl. auch L. REED (Chem. News 1911, 104, 271; Z. 1914, 27, 820), der die Stärke zunächst durch Erhitzen mit Glycerin auf 190° löslich machte und dann mit Jod ausfällte.

<sup>5</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1916, 7, 369.

<sup>6</sup> Derselbe kann 85—90%ig oder stärker sein.

sich die Lösung nur dunkel und scheidet erst nach einigen Stunden oder bis zum nächsten Tage Flocken aus. Man setzt zum Niederschlag eine Aufschwemmung von feinfaserigem, geglühtem Asbest, läßt stehen, bis sich die Fällung abgesetzt hat, am besten einige Stunden, und filtriert durch einen mit Asbest beschickten GOOCH-Tiegel. Um das Filtrieren zu erleichtern, rührt man von Zeit zu Zeit mit einem Platin- oder Hornspatel kräftig um. Nun wäscht man viermal mit einer verdünnten Calciumchloridlösung (die konzentrierte Lösung auf das 10fache verdünnt). Bei ganz geringen Stärkemengen setzt man der Waschflüssigkeit einige Tropfen Jodlösung zu. Darauf wird die Jodstärke durch allmähliche Einwirkung von zuerst verdünntem, kaltem, dann konzentrierterem heißem Alkohol zersetzt. Zu dem Zweck füllt man den Tiegel mit 60%igem Alkohol, saugt einen Teil davon ab, um auch die Asbestschicht damit zu benetzen, rührt den Niederschlag dabei gehörig auf und läßt 5—10 Minuten einwirken. Dann saugt man ab, behandelt in gleicher Weise mit kaltem 85—90%igem Alkohol, wäscht mit 70—100 ccm siedendem Alkohol von derselben Konzentration aus, wobei der Tiegelinhalt vollständig farblos werden soll. Zeigen sich etwa noch dunkle Teilchen, so läßt man auf eine Tiegelfüllung heißen Alkohol einige Zeit einwirken, ohne abzusaugen. Zum Schluß wäscht man zweimal mit etwas kaltem, 95%igem Alkohol und dreimal mit über Chlorcalcium getrocknetem Äther, bringt den Tiegel sofort in einen Wassertrockenschrank und trocknet bis zur Gewichtskonstanz ( $2-2\frac{1}{2}$  Stunden). Der Tiegel wird nun gewogen, geglüht und wieder gewogen. Der Glühverlust entspricht der vorhandenen Stärke.

In einem weiteren Ausbau der Arbeitsweise, besonders für schwierige Fälle wie dextrinreiche und eiweißreiche Nahrungsmittel, wie z. B. Kindernähmehle, bei dem die nach der ersten Vorschrift abgeschiedene Stärke mehr oder weniger durch Eiweiß verunreinigt ist, führt v. FELLEBERG<sup>1</sup> einige Änderungen ein. Die oft schwierig durchführbaren Filtrationen wurden durch Zentrifugieren ersetzt. Für eine Probe mit 12—16% (bei anderen Stärkegehalten sind entsprechend größere oder kleinere Mengen anzuwenden) arbeitet man, wie folgt:

Eine Durchschnittsprobe des Kindermehls wird fein verrieben. 0,25 g werden in ein Reagensglas von etwa 35 ccm Fassungsraum abgewogen, mit etwa 10 ccm Äther übergossen und der Äther nach einigem Stehen oder nach kurzem Zentrifugieren durch vorsichtiges Abgießen entfernt. Man schüttelt nun den Rückstand mit 20 ccm Wasser und 2 ccm 0,05 N.-Jodlösung, zentrifugiert, gießt ab und wiederholt dieselbe Behandlung mit 20 ccm Wasser und 1 ccm Jodlösung. Hierdurch sind der Zucker, das Dextrin und ein großer Teil der Eiweißstoffe entfernt. Der Rückstand wird mit 10 ccm der gesättigten 50%igen Calciumchloridlösung versetzt und 2—3 Minuten gekocht. Man verdünnt mit 15 ccm Wasser, zentrifugiert und gießt die noch durch einige suspendierte Teilchen verunreinigte Lösung durch einen kleinen Wattebausch in einen 100 ccm-Kolben. Der Rückstand wird noch zweimal mit je 5 ccm Calciumchloridlösung etwa 1 Minute lang gekocht, mit 15 ccm Wasser verdünnt und zentrifugiert; die Lösungen werden mit der ersten vereinigt. Der Rückstand wird mit einigen Tropfen Jodlösung auf Stärke geprüft und im positiven Falle noch ein weiteres Mal ausgezogen. Die Stärkelösung wird nun auf 100 ccm aufgefüllt und damit die Bestimmung ausgeführt.

Je 20 ccm werden in einem 35 ccm fassenden Reagensglase mit überschüssiger Jodlösung versetzt, wobei sich die Jodstärke in Flocken abscheidet. Die Lösung muß deutlich gelb gefärbt sein. In der Regel genügen 2 ccm 0,05 N.-Jodlösung. Man schwenkt um, zentrifugiert 3—5 Minuten lang, gießt die überstehende Lösung ab und wäscht den Rückstand zweimal mit 5—10 ccm 60%igem Alkohol unter Zentrifugieren. Nun schüttelt man den Rückstand mit 2 ccm Wasser auf und kocht dieses zur Hauptsache weg, um die Jodstärke in Stärke umzuwandeln und um den Alkohol zu vertreiben. Zur Sicherheit fügt man nochmals 1 ccm Wasser zu und dampft nochmals ab, wobei keine Spur Alkohol zurückbleiben darf.

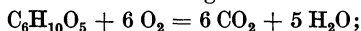
Mit dieser konzentrierten reinen Stärkelösung führt man nun die Chromsäureverbrennung (S. 843) aus:

Man setzt 10 ccm 0,15 N.-Kaliumbichromatlösung hinzu und gießt 20 ccm konz. Schwefelsäure hinein. Sollte die Lösung einen rein grünen Ton annehmen, so fügt man

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG: Z. 1928, 55, 473—475.

sofort noch 1—2 ccm Bichromatlösung und 2—4 ccm Schwefelsäure hinzu. Nach 15 Minuten ist die Verbrennung beendet und man kann zur Rücktitration schreiten. Man gießt die Lösung in einen 400 ccm-Stehkolben, spült mehrmals mit Wasser nach und verdünnt weiter auf etwa 350 ccm. Nach kurzer Zeit, wenn keine Luftblasen mehr sichtbar sind, fügt man etwa 0,1 g Kaliumjodid hinzu und titriert das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurück. Ein Blindversuch zeigt, ob und wie viel Bichromat bereits durch die Schwefelsäure verbraucht wird. Der Betrag wird in Rechnung gesetzt.

Die Verbrennung erfolgt nach der Gleichung:



somit entspricht je 1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung 0,675 mg Stärke.

Kontrollversuche mit Weizenstärke ergaben einen nahezu quantitativen Verlauf der Reaktion. Man fand 98—99% zurück.

In manchen Fällen z. B. in Gemüsekonserven und in vielen anderen Nahrungsmitteln liegt die Stärke teils gequollen, teils kolloid gelöst vor und muß zunächst abgetrennt werden. Zu diesem Zwecke kocht v. FELLEBERG<sup>1</sup> 10 g der Probe mit etwa 50 ccm Wasser auf, kühlt durch ein Stück Verbandstoff, preßt leicht ab und wiederholt das Verfahren noch zweimal mit je 20—30 ccm Wasser, bis der Rückstand mit Jod-Jodkaliumlösung keine Blaufärbung mehr liefert. Das trübe Filtrat wird mit  $\frac{1}{10}$  des Volumens mit 50%iger Calciumchloridlösung und überschüssiger 0,1 N.-Jod-Jodkaliumlösung versetzt, wobei die Jodfärbung ausfällt und abzentrifugiert wird. Die Rückstände werden mit Wasser in ein Reagensglas gespült, dabei die in Lösung gehende Stärke nochmals durch 1—2 ccm Calciumchloridlösung und einige Tropfen Jodlösung sowie Zentrifugieren abgeschieden. Dann fügt man zum Rückstande tropfenweise verdünnte Natriumsulfatlösung, bis die Jodfärbung eben verschwunden ist, stumpft die Säure durch Calciumcarbonat ab und setzt zu der Flüssigkeit für je 1 ccm 1 g geschmolzenes Calciumchlorid hinzu und hält 2 Minuten in leichtem Sieden. Nun wird durch eine Siebplatte, mit stärkefreiem Cellulosebrei bedeckt, filtriert, das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, ein Teil davon mit Jodlösung und  $\frac{1}{10}$  Volumen Calciumchloridlösung ausgefällt. Die Weiterbehandlung ist wie oben, S. 916.

Dieses verhältnismäßig umständliche Verfahren dürfte sich aber bei vielen Nahrungsmitteln mit verkleisterter Stärke vorteilhaft durch das polarimetrische (nach S. 919) ersetzen lassen.

Für das v. FELLEBERGSche Verfahren wurden in der Folgezeit einige andere Abänderungsvorschläge angegeben, die es vereinfachen oder seine Genauigkeit noch erhöhen sollen. So behandelt B. ELEMA<sup>2</sup> die abzentrifugierte Jodstärke mit 60%igem Alkohol, rührt auf, läßt 5—10 Minuten einwirken und zentrifugiert; der Alkohol wird wieder abgehoben. Dies wiederholt er mit kaltem, 90%igem und öfters mit heißem 90%igem Alkohol durch Erhitzen im Wasserbade bei 75—80°, bis die Stärke ganz weiß geworden ist. Darauf wird der Inhalt der Zentrifugengläser in einen Porzellan-Filteriegel gespült, abgesogen, getrocknet, gewogen, gegläht und abermals gewogen, wobei der Wägungsunterschied der Stärke entspricht.

E. LEPIK<sup>3</sup> untersuchte die Bedingungen, unter denen eine Ausflockung der Stärke aus Calciumchloridlösung durch Jod noch eintritt und fand, daß ein Erhitzen auf drei Atmosphären ferner aber auch die Gegenwart von Auszügen mit Phytophthora infestans durchwachsenen Kartoffelknollen sie verhindert. Auch bestätigte er, daß Glykogen durch Jod nicht gefällt wird. Zur Stärkebestimmung benetzt LEPIK 0,1—1 g der fein zerriebenen Substanz in einem 100 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit 5 ccm Wasser und erhitzt dann nach Zusatz von 30 ccm Calciumchloridlösung (1:1) in einem Calciumchloridbade 20 Minuten bei 105° dann noch 5 Minuten durch Kochen, bringt nach Abkühlen im Meßkolben auf 100 ccm und filtriert. 50 ccm des Filtrates werden im Becherglase mit 30 ccm der Calciumchloridlösung, 30 ccm Jodlösung (5 g Jod + 10 g Kaliumjodid im Liter) und 300 ccm warmen (bei Ausfällungsschwierigkeiten kalten) Wassers gemischt und über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wird durch einen GOOCH-Tiegel filtriert und nach der neuen Vorschrift von v. FELLEBERG (S. 917) weiterbehandelt.

G. RANKOFF<sup>4</sup> scheidet die Stärke zunächst nach v. FELLEBERG ab, oxydiert sie dann aber in einer besonderen Vorrichtung mit Kaliumpermanganat und Schwefelsäure zu Kohlendioxyd und bringt dieses wie bei der Elementaranalyse nach Absorption in Natronkalkröhren zur Wägung. In einer Kartoffelstärke mit 98,67% Reinstärke in der Trockensubstanz wurden so 98,22% Stärke gefunden, während das Wägungsverfahren (S. 916) nach v. FELLEBERG 100,09%, also etwas zuviel Stärke lieferte. Doch dürfte das obige

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 78.

<sup>2</sup> B. ELEMA: Zeitschr. angew. Chem. 1929, 42, 199.

<sup>3</sup> E. LEPIK: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1929, 20, 79.

<sup>4</sup> G. RANKOFF: Z. 1927, 53, 138.

Chromsäureverfahren nach v. FELLEBERG, das einfacher ist, ebenfalls diese Ungenauigkeit vermeiden.

### b) Polarimetrische Bestimmung der Stärke.

Da die Stärke eine sehr große Ablenkung des polarisierten Lichtstrahles ( $[\alpha]_D$  je nach Lösungsmittel und Vorbehandlung + 190—202°) bewirkt, die sie begleitenden Hemicellulosen dagegen unter gleichen Bedingungen optisch verhältnismäßig nur wenig aktiv oder ganz inaktiv sind, kann man von den polarimetrischen Stärkebestimmungsverfahren eine gute Brauchbarkeit erwarten, besonders soweit sie bequem und rasch ausführbar sind. Ihre Genauigkeit ist für die meisten Zwecke der praktischen Nahrungsmitteluntersuchung bei sachgemäßer Anwendung ausreichend, besonders dann, wenn es sich um vergleichende Prüfung von Stoffen ähnlicher Art handelt. In besonderen Fällen ist es dabei noch möglich, Störungen durch Begleitstoffe der Stärke durch besondere Maßnahmen bzw. Korrekturen auszuschließen.

Von den verschiedenen Vorschlägen zur polarimetrischen Stärkebestimmung haben folgende eine allgemeine Anwendung gefunden:

a) **Polarimetrische Stärkebestimmung nach J. C. LINTNER und G. BELSCHNER<sup>1</sup>.**  
2,5 g der feinst gepulverten Substanz werden mit 10 ccm Wasser verrieben, dann mit 15—20 ccm konz. Salzsäure (D. 1,19) innig vermischt und das Gemisch eine halbe Stunde stehen gelassen. Darauf spült man mit Salzsäure vom spezifischen Gewichte 1,125 in ein 100 ccm-Kölbchen, setzt 5 ccm einer 4%igen Lösung von phosphorwolframsaurem Natrium<sup>2</sup> hinzu, füllt auf 100 ccm auf, mischt, filtriert und polarisiert im 200- oder wenn nötig im 100 mm-Rohr. Als spezifisches Drehungsvermögen  $[\alpha]_D^{20}$  fand LINTNER im Mittel + 202,0°. Demnach ergibt sich der Stärkegehalt in Gramm, indem man den abgelesenen Drehungswinkel im 200 mm-Rohre mit 0,2475, in Prozenten, indem man den Drehungswinkel mit 9,90 malnimmt.

Das Verfahren von LINTNER und BELSCHNER erfordert sofortige Weiterverarbeitung der salzsauren Stärkelösung, deren Drehung beim Stehen langsam abnimmt. Um dies zu vermeiden, füllt H. J. S. FUHRI SNETHLAGE<sup>3</sup> mit obiger Salzsäure nur bis zu einem Volumen von 60 ccm, dann mit Wasser auf 100 ccm an. Die so entstehende Stärkelösung in 15%iger Salzsäure war tagelang haltbar. — Bei höheren Stärkegehalten (über 50% bzw. 1,25 g Stärke) flockt jedoch leicht etwas Stärke aus, was man durch kleinere Einwaage verhindert.

Nach A. P. SCHULZ und G. STEINHOFF<sup>4</sup> ist beim Verfahren von LINTNER-BELSCHNER die Temperatur streng unter 20° und die Salzsäureeinwirkung möglichst kurz (bis zur Dispergierung) zu halten. Dabei darf mit höchstens 5 ccm 4%iger Natriumwolframatlösung geklärt werden, aber für je 1 ccm derselben ist das Ablesungsergebnis um  $\frac{2}{3}\%$  zu erhöhen.

Statt der Salzsäure kann man nach LINTNER und O. WENGLIN<sup>5</sup> auch 77%ige Schwefelsäure anwenden, wobei aber dann die molekulare Drehung der Stärke eine andere,  $[\alpha]_D = 191,7^\circ$ , wird. Auf die Einzelheiten dieser Ausführungsweise sei indes nur verwiesen.

Das genannte Verfahren mit Salzsäure bewährte sich wegen der beim Klären der Lösungen entstehenden Schwierigkeiten nach unseren Erfahrungen

<sup>1</sup> G. BELSCHNER: Bestimmung der Stärke in Cerealien durch Polarisation. Inaug.-Diss. München 1907. — Das Verfahren ist auf Vorschläge von EFFRONT zurückzuführen.

<sup>2</sup> 120 g Dinatriumphosphat und 200 g Natriumwolframat in Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

<sup>3</sup> H. J. S. FUHRI SNETHLAGE: Chem. Weekbl. 1926, 23, 465.

<sup>4</sup> A. P. SCHULZ u. G. STEINHOFF: Zeitschr. Spiritusind. 1932, 55, 83.

<sup>5</sup> J. C. LINTNER u. O. WENGLIN: Zeitschr. ges. Brauwesen 1908, 31, 53.



bei direkten Stärkebestimmungen in Mehlen weniger als die unter  $\beta$ ) und  $\gamma$ ) genannten, vorzüglich aber, zumal auch wegen seiner Einfachheit, zur Stärkebestimmung in nach J. MAYRHOFER mit alkoholischer Kalilauge vorbehandelten (vgl. S. 913) proteinreichen Nahrungsmitteln, z. B. bei Fleischwaren.

Enthalten die auf Stärke zu untersuchenden Stoffe gleichzeitig wasserlösliche Kohlenhydrate oder Dextrin, so müssen diese vorher durch Ausziehen mit kaltem Wasser entfernt werden. Bei Gegenwart kolloidgelöster (verkleisterter) Stärke wird hierdurch jedoch auch ein Teil der Stärke mitausgezogen. In solchen Fällen empfiehlt es sich daher, nach der unter  $\gamma$ ) angeführten Arbeitsvorschrift zu verfahren.

$\beta$ ) **Polarimetrische Stärkebestimmung nach E. EWERS**<sup>1</sup>. 5 g der lufttrockenen feingepulverten Substanz (von rohen Kartoffeln 10 g) werden mit 25 ccm Salzsäure, die für Getreidestärke 1,124% und für Kartoffel- und Marantastärke 0,4215% Salzsäure enthält, in einem bei 20° 100 ccm fassenden Kolben gleichmäßig zusammengeschüttelt und mit weiteren 25 ccm derselben Säure nachgespült. Der Kolben wird nach nochmaligem Umschwenken genau<sup>2</sup> 15 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, wobei während der ersten 3 Minuten mehrmals umgeschwenkt wird. Sodann wird mit kaltem Wasser auf etwa 90 ccm aufgefüllt, auf 20° abgekühlt, mit molybdänsaurem Natrium geklärt, aufgefüllt, filtriert und polarisiert.

Von der 120 g Molybdänsäure in 1 l enthaltenden Molybdänlösung sollen für 5 g Weizen und Weizenmehl 2,5—3 ccm, für 5 g Gerste, Reis, Mais 2 ccm, für 5—10 g Stärke 0,5 ccm, für 10 g Kartoffeln 1,5 ccm angewendet werden.

Die spezifische Drehung beträgt bei dieser Arbeitsweise bei Kartoffelstärke +195,4°, bei Marantastärke +193,8° und bei den Getreidestärken +181,3 bis 185,9°, je nach ihrer Art.

Nach eigenen Erfahrungen empfiehlt es sich jedoch, stets in gleicher Weise mit 1,124%iger Salzsäure zu erhitzen und zwecks besserer Klärung der Polarisationslösungen mit phosphorwolframsaurem Natrium<sup>3</sup> bei Gegenwart größerer Mengen Salzsäure (20 ccm 25%ige Salzsäure auf 100 ccm Lösung) zu klären. Die spezifische Drehung der Stärke nimmt man, um besser vergleichbare Werte zu erhalten, einheitlich zu 183,7°<sup>4</sup> an.

Ein Apparat, bestehend aus Topf mit geeignetem Einsatz, für die Stärkebestimmung nach EWERS beschreibt C. GRIMME<sup>5</sup>. Mit der Vorrichtung können gleichzeitig 8 Bestimmungen nebeneinander ausgeführt werden.

In Nachprüfung der Stärkebestimmung nach LINTNER und EWERS kommen J. KÖNIG, W. GREIFENHAGEN und A. SCHOLL<sup>6</sup> zu dem Ergebnis, daß sich diese Verfahren für alle Stärkearten anwenden lassen. Das spezifische Drehungsvermögen war bei dem LINTNERSchen Verfahren ziemlich gleichmäßig +202°, bei dem EWERSschen Verfahren war es etwas verschieden; doch kann für Mais, Reis, Weizen, Roggen, Gerste und Hafer der mittlere<sup>7</sup>

<sup>1</sup> E. EWERS: Zeitschr. öffentl. Chem. 1908, 14, 150.

<sup>2</sup> Die scheinbare spezifische Drehung ist stark von der Erhitzungsdauer abhängig. So fanden S. HALS und S. HEGGENHOUGH (nach MANNICH u. LENZ: Z. 1920, 40, 3) für:

|             |         |         |         |         |         |         |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Minuten:    | 3       | 6       | 11      | 15      | 28      | 60      |
| Kreisgrade: | + 205,9 | + 201,5 | + 189,4 | + 183,7 | + 163,5 | + 118,7 |

<sup>3</sup> 120 g Dinatriumphosphat und 200 g Natriumwolframat werden in Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

<sup>4</sup> Vgl. Anmerkung<sup>7</sup> und Anmerkung<sup>2</sup> auf folgender Seite.

<sup>5</sup> C. GRIMME: Z. 1913, 25, 726. — Die Vorrichtung ist von Albert Dargatz in Hamburg 1, Pferdemarkt 66 zu beziehen.

<sup>6</sup> J. KÖNIG, W. GREIFENHAGEN u. A. SCHOLL: Z. 1911, 22, 709—723.

<sup>7</sup> Von ihnen zu 183,3° angegeben.

Drehungswinkel angenommen werden. Zu prüfende Stoffe sind aber vorher mit Wasser, Alkohol und Äther auszuwaschen. — Cellulose, Hemicellulose und Pentosane beeinflussen das Ergebnis nicht wesentlich. Auch bei Kakao, Zimt und Pfeffer waren die Verfahren geeignet, doch ist nach ihnen bei Zimt und Kakao das LINTNERSche, bei Pfeffer das EWERSsche vorzuziehen. Bei Zimt empfiehlt sich ein besonders sorgfältiges Auswaschen mit Alkohol zur Beseitigung sonstiger optischer Bestandteile.

H. v. SCHÉELE und G. SVENSSON<sup>1</sup> behandeln von Mehlen das halbe Normalgewicht gleich 4,745 g<sup>2</sup> nach EWERS, wobei beim Erhitzen besonders in den ersten 3 Minuten öfters umzuschütteln ist, füllen nach dem 15 Minuten langem Erhitzen mit Wasser auf 90 ccm auf, kühlen auf 20° ab, fällen mit einer 4%igen Phosphorwolframsäurelösung<sup>3</sup> die Eiweißstoffe aus, füllen zur Marke auf, filtrieren und polarisieren im 200 mm-Rohr. Der abgelesene Drehungswinkel in VENTZKE-Graden (vgl. S. 875) mal 2 ergibt den Prozentgehalt an Stärke, wenn man bei Weizen und Gerste 1,0, bei Mais und Gerstenkleie 2,0, bei Weizenkleie und Reisfuttermehl 3,0, bei Roggenkleie 0,5% als Korrektur abzieht, bei Hafer 1,0, bei Haferkleie und Haferfuttermehl 2,0% hinzuzählt.

Auch H. LÜHRIG<sup>4</sup> empfiehlt das Verfahren von EWERS, mit dem er mit den Verfahren von MANNICH und LENZ (vgl. S. 922) übereinstimmende Werte erhielt. A. DÜRING<sup>5</sup> wendete das EWERSsche Verfahren mit Erfolg auch auf nach MAYRHOFER (S. 913) aus Fleischwaren abgeschiedene Stärke an, was auch V. JAHN<sup>6</sup> empfiehlt. Hierbei ist jedoch der Einfluß des in der abgeschiedenen Stärke enthaltenen Kaliumhydroxydes auf den Säurezusatz durch vorherige Neutralisation gegen Phenolphthalein auszuschalten.

Auf ähnlicher Grundlage wie das Verfahren von EWERS beruht die Stärkebestimmung nach P. LEHMANN und E. SCHOWALTER<sup>7</sup> für Wurstwaren.

γ) Polarimetrische Stärkebestimmung nach J. GROSSFELD<sup>8</sup>. In vielen Lebensmitteln, die neben Stärke gleichzeitig andere wasserlösliche Kohlenhydrate enthalten, liegt die Stärke in gequollener (verkleisteter) Form vor, so daß ein Ausziehen dieser Stoffe mit Wasser zwecks Entfernung der störenden Kohlenhydrate zu Stärkeverlusten führen würde. Die Beobachtung von GROSSFELD<sup>9</sup> aber, daß solche verkleisterte Stärke durch Bleiessig in Gegenwart von Tannin quantitativ ausgefällt werden kann, führte zu der Möglichkeit, auch unter den genannten Umständen die Stärke polarimetrisch zu bestimmen.

Die Grundlage des Verfahrens, daß nämlich der mit Tannin und Bleiessig entstehende Niederschlag kolloidgelöste Stärke vollständig, Dextrin dagegen nur in geringeren Mengen<sup>10</sup> ausfällt, wurde von C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>11</sup> nachgeprüft und bestätigt.

Die Ausführung der Stärkebestimmung nach diesem Verfahren folgt im wesentlichen der Arbeitsweise von EWERS mit dem Unterschiede, daß die Ausfällung der Proteinstoffe, weil wirksamer, in stärker salzsaure Lösung vorgenommen wird, wodurch aber der Drehungswinkel der Stärke nicht beeinflußt wird:

<sup>1</sup> H. v. SCHÉELE u. G. SVENSSON: Zeitschr. ges. Getreidewesen 1929, 16, 15; Z. 1932, 63, 343.

<sup>2</sup> Entsprechend der von v. SCHÉELE und SVENSSON gefundenen mittleren spezifischen Drehung von 182,0°.

<sup>3</sup> Bei reiner Stärke genügen 2—3 Tropfen, bei Getreide 5,0—7,5 ccm, bei Kleien 5 bis 20 ccm.

<sup>4</sup> H. LÜHRIG: Pharm. Zentralh. 1921, 62, 141; Z. 1923, 45, 160.

<sup>5</sup> A. DÜRING: Z. 1924, 47, 248.

<sup>6</sup> V. JAHN: Z. 1927, 53, 262.

<sup>7</sup> P. LEHMANN u. E. SCHOWALTER: Z. 1912, 24, 325.

<sup>8</sup> Vgl. C. BAUMANN u. J. GROSSFELD: Z. 1917, 33, 97.

<sup>9</sup> J. GROSSFELD: Z. 1915, 29, 55.

<sup>10</sup> Bei käuflichen „Dextrin“ wird (vgl. GROSSFELD, Z. 1915, 29, 54) unter obigen Bedingungen der Klärung eine Abnahme des Drehungswinkels einer 5%igen Lösung von 14,95 auf 13,90°, bei Stärkesirup von 7,09 auf 6,92° beobachtet.

<sup>11</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Nachweis eines Dextrinzusatzes in Succus liquiritiae. Apoth.-Ztg. 1930, 45, 1566.

A. 10 g<sup>1</sup> des zu prüfenden pulverförmigen Stoffes werden in einem 100 ccm-Kölbchen mit 75 ccm Wasser 15 Minuten, bei Gegenwart von Dextrin länger — bis zu 1 Stunde — unter häufigerem Umschütteln ausgelaut, dann mit 5 ccm Tanninlösung (1:10) vermischt, unter weiterem Umschütteln 5 ccm Bleiessig zugegeben, schließlich mit gesättigter Natriumsulfatlösung aufgefüllt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. 50 ccm (= 5 g Substanz) des stärkefreien Filtrates<sup>2</sup> werden sodann mit 3 ccm 25%iger Salzsäure versetzt, im kochenden Wasserbade 15 Minuten erhitzt, nach dem Erkalten mit 20 ccm 25%iger Salzsäure und 5 ccm einer Lösung von phosphorwolframsaurem Natrium<sup>3</sup> versetzt und nach Auffüllen mit Wasser und Filtrieren durch feinporiges Papier im 200 mm-Rohr polarisiert.

B. In weiteren 5 g des Stoffes wird die gesamte Stärkepolarisation im 200 mm-Rohr nach EWERS (S. 920) mit 1,124%iger Salzsäure aber gleichfalls unter Klärung mit phosphorwolframsaurem Natrium unter Zusatz von 20 ccm Salzsäure bestimmt.

C. Der Unterschied der beiden Drehungswinkel ( $B - A$ ), mal 5,444<sup>4</sup>, ergibt den Prozentgehalt des Stoffes an Stärke.

Nach diesem Verfahren wird der Stärkegehalt eines Stoffes richtig gefunden, solange nicht andere in Wasser unlösliche, aber in verd. Salzsäure beim Erhitzen nach EWERS löslich werdende und optisch aktive Kohlenhydrate vorhanden sind. Im allgemeinen ist die Menge solcher Stoffe in Lebensmitteln so klein, bzw. ihre Drehung so gering (meist unter 1% Stärke entsprechend), daß man sie vernachlässigen kann. Wenigstens gilt dies für Kartoffeln, Mehle, Backwaren, Kakao und Gewürze, und besonders für vergleichende Untersuchungen.

Will man den Einfluß solcher Stoffe dagegen berücksichtigen, so berechnet man die Stärke nach der Formel

$$\text{Stärke} = (B - A - k) \times 5,444\%,$$

worin  $k$  eine für das betreffende Nahrungsmittel geltende Korrekturkonstante ist, die man durch Untersuchung des stärkefrei gehaltenen Nahrungsmittels oder durch Stärkebestimmung nach einem anderen, genaueren Verfahren für den betreffenden Gegenstand durch besonderen Versuch ermittelt. So kann man für Backmassen (Persipanmassen) nach J. GROSSFELD<sup>5</sup>  $k$  mit 0,18<sup>6</sup> oder entsprechend den obigen Korrekturen von v. SCHÉELE und SVENSSON (S. 921) für Weizen und Gerste mit 0,18, für Mais und Gerstenkleie mit 0,37, für Weizenkleie und Reisfuttermehl mit 0,54, bei Hafer mit — 0,19, bei Haferkleie und Haferfuttermehl mit — 0,36 einsetzen. Cocoskerne wurden auf meine Veranlassung von K. JOACHIMSOHN<sup>7</sup> geprüft; sie fand, bezogen auf fettfreie Trockenmasse, den sehr niedrigen Wert  $k = 0,10^0$ , entsprechend 0,5%, oder bezogen auf den fetthaltigen lufttrockenen Kern 0,2% scheinbarer Stärke.

d) Polarimetrische Stärkebestimmung nach C. MANNICH und K. LENZ<sup>8</sup>. Dieses Verfahren hat gegenüber den bisher genannten den Vorzug, daß zur Herstellung der Stärkelösung die Anwendung von Mineralsäuren völlig vermieden wird. Zur Lösung der Stärke dient hier ähnlich wie bei dem Verfahren nach v. FELLEBERG (S. 916) Calciumchloridlösung, der wenig Essigsäure zugesetzt wird. Die spezifische Drehung der Stärke beträgt unter diesen Bedingungen + 200<sup>0</sup>. Als Fällungsmittel für Proteinstoffe verwenden MANNICH

<sup>1</sup> Man kann bei A auch 5 g des Stoffes verwenden, muß dann aber im 400 mm-Rohr polarisieren oder den im 200 mm-Rohr erhaltenen Drehungswert verdoppeln.

<sup>2</sup> Der Rest des Filtrates kann zur Prüfung auf Zucker verwendet werden.

<sup>3</sup> 120 g Dinatriumphosphat und 200 g Natriumwolframat im Liter.

<sup>4</sup> Entsprechend dem mittleren Drehungswinkel der Stärke nach EWERS.

<sup>5</sup> J. GROSSFELD: Z. 1927, 53, 156. — Vgl. auch A. GRONOVER u. E. WOHLNICH: Z. 1927, 53, 252.

<sup>6</sup> Hier empfiehlt es sich auch das Volumen des Unlöslichen (vgl. S. 882) beim Auffüllen auf 100 ccm infolge des vorhandenen Fettes durch den Korrekturfaktor 0,97 zu berücksichtigen, entsprechend also der Formel:

$$\text{Stärke} = (B - A - 0,18) 5,444 \cdot 0,97 = (B - A - 0,18) 5,28\%.$$

<sup>7</sup> K. JOACHIMSOHN: Privatmitteilung.

<sup>8</sup> C. MANNICH u. K. LENZ: Z. 1920, 40, 1.

und LENZ Zinnchlorürlösung. Ihre Arbeitsweise im einzelnen ist z. B. für Mehl folgende:

2,5 g Mehl werden in einer gestielten Porzellanschale von 250 ccm Inhalt mit 10 ccm Wasser angerieben, das Pistill mit 60 ccm Calciumchloridlösung (hergestellt aus 2 Teilen kristallisiertem Salz und 1 Teil Wasser) abgespült, 1 ccm 0,8%ige Essigsäure hinzugefügt und die Mischung auf einem Messingdrahtnetz unter Umrühren zum Sieden erhitzt. Sodann wird mit halbgroßer Flamme 15 Minuten in schwachem Kochen erhalten, wobei das Gefäß mit einem großen Uhrglase zu bedecken ist. Dann wird durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt und die Lösung in einen 100 ccm-Kolben übergeführt. Die Schale wird unter Verwendung eines Gummiwischers ausgewaschen und das Volumen im Kolben mit der Waschflüssigkeit auf 100 ccm gebracht. Schließlich wird durch feinporiges Filtrierpapier<sup>1</sup> filtriert und im 200 mm-Rohr im Halbschattenapparat polarisiert. — Will man einen durch gelöste Proteinstoffe bedingten Fehler ausschalten, so kann man vor dem Auffüllen mit 5 ccm einer 20%igen Lösung von Zinnchlorür in Calciumchloridlösung klären oder noch besser in einem blinden Versuch 2,5 g Mehl 30 Minuten unter zeitweiligem Umschütteln mit 100 ccm Calciumchloridlösung ausziehen, filtrieren und den Drehungswert des Filtrates (Vorzeichen berücksichtigen!) von der Mehl- abkochung abziehen.

Der Prozentgehalt des Mehles berechnet sich aus dem abgelesenen Drehungswinkel  $\alpha$ , der Länge  $l$  des Polarisationsrohres in dm, und der Substanzmenge  $s$  in g:

$$\text{Stärke} = \frac{100 \cdot \alpha \cdot 100}{l \cdot 200 \cdot s} = \frac{50}{1 \cdot s}$$

$$\text{oder für } l = 2 \quad s = 2,5$$

$$\text{Stärke} = \frac{50 \alpha}{2 \cdot 2,5} = 10 \alpha.$$

ε) Ebenfalls ohne Mineralsäure, nämlich durch Einwirkung von Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd erhalten A. P. SCHULZ und G. STEINHOFF<sup>2</sup> eine polarisierbare Stärkelösung: 0,5 g Mehl werden im 100 ccm-Maßkolben mit 5 ccm Wasser durchgeschüttelt und mit 1 ccm 10%iger Natronlauge verkleistert. Dann wird nach Zusatz von 10 ccm 3%iger Wasserstoffsuperoxydlösung auf dem siedenden Wasserbade eben bis zum Klarwerden (3 Minuten) erwärmt, sofort abgekühlt und mit Essigsäure gegen Phenolphthalein neutralisiert. Eine Klärung kann nötigenfalls mit Ferrocyankalium und Zinklösung (vgl. S. 881) erfolgen, doch dürfen höchstens je 3 ccm beider Lösungen verwendet werden. Die spezifische Drehung der Stärke beträgt bei dieser Behandlung 193,6°. — Statt mit Natronlauge kann die Dispergierung der Stärke auch mit Ammoniak erfolgen.

### e) Bestimmung der Stärke durch Überführung in Zucker.

α) Bestimmung durch Kochen mit verdünnten Säuren. Durch Kochen mit verdünnten Säuren wird vorhandene Stärke in Glucose verwandelt, die als solche bestimmt werden kann. C. J. LINTNER hat für den Zweck 2%ige Salzsäure vorgeschlagen; auch J. KÖNIG und W. SUTTHOFF<sup>3</sup> haben gefunden, daß eine 2%ige Salzsäure für die Hydrolyse der Stärke ausreicht. Nach ihnen werden 3 g Substanz mit 200 ccm Wasser und 16 ccm 25%iger Salzsäure versetzt und 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wird mit Natronlauge neutralisiert, nach dem Erkalten auf 250 oder 300 ccm aufgefüllt und gemischt; je 25 ccm der Lösung dienen zur Bestimmung des Gesamtreduktionswertes und 200 ccm zur Bestimmung der Pentosane (vgl. S. 928). Nach Abzug des den letzteren entsprechenden Reduktionswertes, berechnet als Xylose, vom

<sup>1</sup> Hier dürfte sich auch Kieselgurfiltrierpapier (vgl. S. 840) eignen. — MANNICH und LENZ empfehlen Schleicher & Schüll, Faltenfilter hart Nr. 605.

<sup>2</sup> A. P. SCHULZ u. G. STEINHOFF: Zeitschr. Spiritusind. 1932, 55, 83.

<sup>3</sup> J. KÖNIG u. W. SUTTHOFF: Landw. Vers.-Stationen 1909, 70, 343.

Gesamt-Reduktionswert erhält man einen Ausdruck für den Stärkewert, der allerdings noch den von den Hexosanen der Hemicellulosen herrührenden Reduktionswert mit einschließt. Nach den Erfahrungen bei der Säurehydrolyse von Dextrin (S. 911), in das die Stärke beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure schnell übergeht, scheint ein einstündiges Erhitzen mit etwa N.-Salzsäure im siedenden Wasserbade auszureichen, wie auch C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>1</sup> bestätigt fanden.

Wegen der Hydrolyse der Hexosane liefert dieses Verfahren höhere Ergebnisse als die bisher genannten und als dem wahren Stärkegehalt entspricht. Man pflegt daher auch die so gefundenen Zahlen als „Stärkewert“ oder „In Zucker überführbare Stoffe“ zu bezeichnen. Die Abweichungen sind oft recht beträchtlich. So fand nach v. FELLEBERG<sup>2</sup> ARRAGON in völlig stärkefreien Gewürzen durch Säurehydrolyse noch 12–40% Kohlenhydrate. v. FELLEBERG<sup>2</sup> fand in Kleie 30,9% in Zucker überführbare Stoffe, davon allein 23,1% Xylose; vgl. auch ALPERS und ZIEGENSPECK, S. 927.

Auf alle Fälle ist es zu empfehlen, die Stoffe, die irgendwie nennenswerte Mengen fertig gebildete Zuckerarten und Dextrine enthalten, vorher durch Ausziehen mit kaltem Wasser hiervon zu befreien und erst den entzuckerten Rückstand zu verwenden. Denn Zuckerlösungen werden sowohl durch Dämpfen als auch durch Kochen mit Salzsäure teilweise humifiziert, teilweise revertiert und üben je nach dem Gehalt an Zucker und je nach der Aufschließungsdauer in jedem Falle einen verschiedenen störenden Einfluß aus. Um diesen ganz auszuschalten werden die Zucker daher am besten vorher entfernt.

β) **Bestimmung der Stärke durch Verzuckerung mittels Diastase.** Da man von dieser Bestimmung wegen der spezifischen Wirkung der Diastase auf Stärke wie bei anderen Enzymreaktionen besonders genaue Ergebnisse erwartete, ist sie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, von denen folgende genannt seien:

M. MÄRKER<sup>3</sup> ersetzte das früher übliche Hochdruckverfahren von REINKE durch ein Diastaseverfahren, verbunden mit Hydrolyse durch Salzsäure, eine Arbeitsweise, die von C. J. LINTNER<sup>4</sup> verbessert wurde. T. CHRZASZCZ<sup>5</sup> zeigte, daß neben der guten Verkleisterung der Säuregrad von großem Einfluß auf die Verzuckerung ist und daß nach Ergebnissen verschiedener Forscher die günstigste Wirkung der Amylase bei etwa  $p_H = 5$  bis höchstens 5,3 liegt. C. AMBERGER<sup>6</sup> stellte bei verschiedenen Stärkesorten eine verschiedene Angreifbarkeit fest, die er sogar zur mikroskopischen Unterscheidung verwendet. O. WOLFF<sup>7</sup> benutzt für praktische Zwecke zur Messung der durch Diastase eingetretenen Verzuckerung der Stärke im Vergleich zu einem Versuch mit reiner Stärke das Interferometer; B. ELEMA<sup>8</sup> weist auf einige Schwierigkeiten dieser Methode bei der Stärkebestimmung in Kartoffeln hin. F. KAULFERSCH<sup>9</sup> stellte fest, daß Diastase in einer Sardellenzubereitung durchaus nicht alle Stärke in Lösung brachte. C. J. LINTNER und M. KIRSCHNER<sup>10</sup> fanden, daß beim diastatischen

<sup>1</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Apoth.-Ztg. 1930, 45, 1566.

<sup>2</sup> Th. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene. 1916, 7, 369.

<sup>3</sup> M. MÄRKER: Handbuch der Spiritusfabrikation, 7. Aufl., S. 111. Berlin 1898.

<sup>4</sup> C. J. LINTNER: Zeitschr. angew. Chem. 1898, 11, 726. — Nach CHRZASZCZ: vgl. folgende Anmerkung.

<sup>5</sup> T. CHRZASZCZ: Z. 1924, 48, 306.

<sup>6</sup> C. AMBERGER: Z. 1921, 42, 181.

<sup>7</sup> O. WOLFF: Zeitschr. angew. Chem. 1924, 37, 206; Z. 1925, 49, 295.

<sup>8</sup> B. ELEMA: Zeitschr. angew. Chem. 1929, 42, 199.

<sup>9</sup> F. KAULFERSCH: Z. 1920, 39, 344.

<sup>10</sup> C. J. LINTNER u. M. KIRSCHNER: Zeitschr. angew. Chem. 1923, 36, 119; Z. 1924, 48, 186.

Abbau neben Maltose aus Stärke auch gegen Diastase widerstandsfähiges Achroodextrin gebildet wurde.

Wegen dieser Unsicherheit bei der Verzuckerung verfährt A. R. LING<sup>1</sup>, wie folgt: 5 g der feingemahlten Substanz werden im SOXHLET-Apparat 3 bis 3½ Stunden mit Alkohol vom spezifischen Gewicht 0,920 ausgezogen. Zweckmäßig wird der aufgesetzte Kühler in den SOXHLET-Aufsatz eingeschliffen. Nach genügender Extraktion läßt man den Alkohol abtropfen, spült den Patroneninhalt mit etwa 100 ccm Wasser in ein 300 ccm-Becherglas. Dann verkleistert man die Stärke durch Kochen bei ununterbrochenem Rühren. Die Flüssigkeit soll darauf nicht mehr nach Alkohol riechen. Sodann wird auf 57° abgekühlt und in ein Wasserbad von gleicher Temperatur gebracht. Man füllt nun 10 ccm eines Malzextraktes von bekannter diastatischer Wirkung hinzu und läßt 1 Stunde lang bei der genannten Temperatur einwirken, indem man mittels eines Glasstabes in Zwischenräumen von 5 Minuten umrührt. Darauf wird die Inversionsflüssigkeit aufgeköcht und in ein 200 ccm-Kölbchen filtriert. Die unlöslichen Stoffe werden tüchtig ausgewaschen und das Filtrat mitsamt den Waschwässern auf 200 ccm gebracht. In dieser Lösung wird mit FEHLING'scher Lösung der Zucker bestimmt und das Ergebnis um den Zuckergehalt des Malzextraktes, in einem blinden Versuch ermittelt, vermindert. Weiterhin wird der Prozentsatz an Maltose festgestellt, die der Malzextrakt aus trockener Gersten- oder Weizenstärke erzeugt.

Der Prozentgehalt an Stärke in der zu prüfenden Substanz aus der gefundenen Maltose berechnet sich nach der Formel

$$S = 94,73 \frac{M'}{M},$$

worin  $M$  den Prozentgehalt an Maltose bedeutet, die das Malz aus trockener Gersten- oder Weizenstärke erzeugt,  $M'$  den Prozentgehalt an Maltose in der zu prüfenden Substanz.

Nach C. v. SCHÉELE und G. SVENSSON<sup>2</sup> besonders zu empfehlen ist die Stärkebestimmung nach LÜERS und WIENINGER<sup>3</sup>, die eine Abänderung des Verfahrens von LING darstellt:

3 g der feingemahlten Substanz werden in einem 200 ccm-Meßkolben am Rückflußkühler ½ Stunde mit 100 ccm Wasser schwach gekocht. Nach Zugabe von 10 ccm SÖRENSENSCHER Phosphatpufferlösung ( $p_H = 6,24$ ) wird auf 65° abgekühlt und 0,1 g „Diastase absolut“ von MERCK<sup>4</sup>, die in 5 ccm Wasser aufgeschlämmt ist, mit zweimal 2,5 ccm Wasser dazugespült. Nach zwei-stündigem Stehen im Thermostaten bei 63° und mehrfachem Umschütteln wird der Inhalt des Kolbens wie oben ½ Stunde gekocht und mit aufgeschlämmter Diastase versetzt, wieder ½ Stunde bei 63° belassen, aufgeköcht und auf Zimmertemperatur abgekühlt. Jetzt wird die Lösung mit 10 ccm N.-Salzsäure, 3—5 ccm Phosphorwolframsäure und Wasser zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und filtriert. 50 ccm des Filtrates werden mit 2,5 ccm N.-Kalilauge neutralisiert, mit 25 ccm 0,1 N.-Jodlösung und 30 ccm 0,1 N.-Kalilauge versetzt, nach genau 10 Minuten mit 4—5 N.-Salzsäure angesäuert und mit 0,05 N.-Natriumthiosulfat titriert (vgl. S. 890). Das Ergebnis wird um den Jodverbrauch korrigiert, den die wasserlöslichen Stoffe verursachen.

Zu ihrer Bestimmung überschichtet man 15 g der feingemahlten Probe im Becherglas 1 cm hoch mit absolutem Alkohol und stellt mit einem Uhrglas bedeckt ½ Stunde auf das

<sup>1</sup> A. R. LING: Journ. Soc. chem. Ind. 1923, 42, 48; Z. 1924, 47, 455.

<sup>2</sup> C. v. SCHÉELE u. G. SVENSSON: Teknisk Tidskr. Kemi 1928, 58, 57 u. 65; Z. 1932, 63, 343.

<sup>3</sup> H. LÜERS u. F. WIENINGER: Zeitschr. ges. Brauwesen 1925, 48, 35; C. 1925, II, 1396.

<sup>4</sup> Derartige Präparate sind, da sie sich nur schwer mit Wasser benetzen, vor Verwendung sorgfältig mit Wasser anzureiben. Durch Auflösen in Glycerin erhält man haltbare Lösungen.

Wasserbad, wobei verdampfender Alkohol nachzufüllen ist. Dann wird der Alkohol vertrieben, die Probe  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $100^{\circ}$  getrocknet, quantitativ in ein 400 ccm-Beherglas übergeführt, 250 ccm Wasser zugegeben und 1 Stunde unter häufigem Umrühren stehen gelassen. 50 ccm davon (= 3 g) werden auf 100 ccm verdünnt, mit Diastase behandelt und wie oben weiter verarbeitet. Hier genügen 10 ccm 0,1 N.-Jodlösung.

Wenn bei der Bestimmung der Stärke  $a$  ccm 0,05 N.-Jodlösung und beim Korrektionsversuch  $b$  ccm davon verbraucht werden, so ist der Maltosegehalt =  $(a - b) \times 1,14$ . Hieraus folgt der prozentuale Gehalt an Stärke durch Multiplikation mit dem Faktor  $f = 1,29$  bei Weizen,  $f = 1,30$  bei Roggen,  $f = 1,27$  bei Gerste.

Für eine polarimetrische Bestimmung werden 3 g Substanz genau wie oben mit Diastase behandelt. Nachdem der Kolben auf 200 ccm aufgefüllt und der Inhalt umgeschüttelt und filtriert ist, wird im 200 mm-Rohr polarisiert. Ebenso wird der Blindversuch angesetzt. Bei der Berechnung geht man davon aus, daß 3 g reine Stärke in 200 ccm Wasser wie bei der Hauptprobe behandelt im 200 mm-Rohr  $13,8^{\circ}$  V. drehen.

Z. CHRZASZCZ<sup>1</sup> empfiehlt zur Verzuckerung der Stärke mit Diastase folgende Arbeitsweise:

α) Vermahlung. Die stärkehaltigen Stoffe sollen möglichst fein vermahlen werden. Grobgemahlene Stoffe können erst bei 3—4 Atmosphären Druck aufgeschlossen werden.

β) Verkleisterung. Die Substanz wird in 2 Anteilen von je 3 g abgewogen, in 250 ccm fassende Kölbchen hineingeschüttet und mit je 100 ccm Wasser vermengt. Unter schwachem Umschütteln wird 10 Minuten im kochenden Salzbad (etwa  $106^{\circ}$ ) verkleistert, dann werden 2 ccm  $\frac{1}{10}$  N.-Schwefelsäure oder ein anderes Puffergemisch hinzugegeben, damit der Säuregrad etwa  $p_H = 5$  beträgt, worauf die Kolben schnell in den Autoklaven hineingestellt und  $\frac{1}{2}$  Stunde darin gehalten werden. Gewöhnlich stellt man den Dampfdruck auf 3 Atmosphären ein, bei grobgemahlenden Stoffen auf 4, bei feingemahlenden, besonders wenn sie noch Zucker enthalten, auf  $\frac{1}{2}$ —2 Atmosphären; bei feingemahlenden Stoffen gelingt die Aufschließung auch ohne Druck.

γ) Verzuckerung. Nach Herausnahme der Kolben aus dem Autoklaven kühlt man ihren Inhalt auf  $70^{\circ}$  ab, gibt 30 ccm 10%igen Malzauszug hinzu und verzuckert dann im Wasserbad bei  $65$ — $70^{\circ}$  so lange, bis die Flüssigkeit mit Bodensatz bei der Jodreaktion eine hellgelbe Farbe zeigt. Gewöhnlich dauert die Verzuckerung 30—60 Minuten. Den Malzauszug erhält man durch Iständiges Schütteln von Malz mit der 10fachen Menge Wasser; er wird dann bis zum Klarwerden filtriert. Der Kolben, den man zur Prüfung mit Jod verwendet hat, wird entfernt, der Inhalt des anderen auf 250 ccm gebracht, wovon dann 200 ccm abfiltriert werden.

δ) Inversion. 200 ccm des Filtrates werden in einem 500 ccm-Kolben mit 10 ccm 25%iger Salzsäure im kochenden Wasserbad 1— $\frac{1}{2}$  Stunden erhitzt. Dann wird mit Natronlauge neutralisiert, auf 500 ccm aufgefüllt und der Zucker mit alkalischer Kupferlösung (vgl. S. 860) bestimmt. Gleichzeitig werden 50 ccm Malzauszug in einem 250 ccm-Kolben auf 200 ccm verdünnt und in gleicher Weise 1 Stunde invertiert. Die darin gebildete Menge Zucker ist von der des Hauptversuches abzuziehen.

E. H. HALL<sup>2</sup> wendet gegen das Verfahren von LING ein, daß damit nur die Amylose, nicht die Gesamtstärke bestimmt werde und gibt zur Bestimmung „aller Substanz, die vom Stärkekorn geometrisch eingeschlossen“ ist, eine besondere Vorschrift an.

Statt Malzdiastase ist zur Verzuckerung der Stärke auch Takadiastase empfohlen worden. G. S. FRAPS<sup>3</sup> erhielt in vergleichenden Versuchen in Futtermehl mit dieser fast den gleichen Stärkegehalt (44,42 gegen 45,07%) wie mit Malzdiastase.

Bei dieser Stärkebestimmung mittels Malzauszug oder Diastase ist besonders folgendes zu beachten:

1. Wenn die Stoffe Zucker und Dextrin enthalten, so müssen diese entweder in einer besonderen Probe für sich bestimmt und von dem nach der Hydrolyse gefundenen Zucker abgezogen oder durch Auswaschen mit kaltem Wasser entfernt werden.

2. Sehr fettreiche Stoffe werden vorher durch Ausziehen mit heißem Alkohol oder Äther entfettet.

3. Außer Stärke gehen durch Diastase auch noch andere Stoffe in Lösung; besonders werden durch das Kochen der diastasierten Lösungen mit Salzsäure noch aus anderen Anhydriden (z. B. aus Pentosanen) reduzierende Zuckerarten gebildet. Am nächsten würde man daher dem wahren Stärkekern erhalten, wenn man die Hydrolyse mit Salzsäure

<sup>1</sup> Z. CHRZASZCZ: Z. 1924, 48, 306—311.

<sup>2</sup> E. H. HALL: Journ. Soc. chem. Ind. 1931, 50, 429.

<sup>3</sup> G. S. FRAPS: Journ. Assoc. official. agricult. Chemists 1932, 15, 304.

umgehen und den Zucker in der diastasierten Lösung durch Gärung bestimmen würde. Durch Behandlung mit Diastase wird aber nicht alle Stärke in Maltose übergeführt, sondern bilden sich selbst bei der vollkommensten Diastasierung stets mehr oder weniger Dextrine und gibt es bis jetzt keine Hefe (vgl. S. 904), die mit Sicherheit alle Dextrine vergärt.

#### d) Sonstige Verfahren der Stärkebestimmung.

A. v. ASBOTH<sup>1</sup> hat zur Bestimmung der Stärke Filtration mit Bariumhydroxydlösung vorgeschlagen, ohne daß dieses Verfahren bisher Nachahmung gefunden hat.

Eine colorimetrische Bestimmung der Stärke durch Messung der mit Jod eintretenden Blaufärbung ist vor allem durch den Umstand erschwert, daß in der Jodstärke die beiden Komponenten nicht in konstantem Verhältnis zueinander stehen, sie kann daher höchstens zur ungefähren Abschätzung etwaiger kleiner Mengen Stärke neben großen Mengen anderer Kohlenhydrate in Frage kommen. Die Verfahren von E. SEYFERT<sup>2</sup>, von F. W. KÜSTER<sup>3</sup> sowie auch das von M. DENNSTEDT und F. VOIGTLÄNDER<sup>4</sup> haben sich nach H. WITTE<sup>5</sup> als ungenau erwiesen. H. ECKART<sup>6</sup> mißt kleine Mengen Stärke in Pektinsäften an der mit Jod entstehenden Blaufärbung im Titriercoloroskop nach LÜERS<sup>7</sup>, hat aber das Verfahren später in Gemeinschaft mit A. DIEM<sup>8</sup> durch Ausfällung nach v. FELLEBERG, Abschleudern des Niederschlages und „sedimetrische“ Messung des Volumens ersetzt.

In welchem Maße die Ergebnisse der Stärkebestimmung nach verschiedene Verfahren voneinander abweichen können, zeigen einige vergleichenden Versuche von K. ALPERS und H. ZIEGENSPECK<sup>9</sup>, an derselben Substanz. Sie erhielten z. B. für ein 65%iges Weizenmehl und ein Weizenmehlnachmehl (Kleie):

Tabelle 20.

| Art des Verfahrens  | Stärke bei      |            |
|---|-----------------|------------|
|   | Weizenmehl<br>% | Kleie<br>% |
| 1. Nach MAYRHOFER (für Wurst) . . . . .                                   | 69,6            | 40,6       |
| 2. Dasselbe mit Hydrolyse der Stärke und Zuckerbestimmung                 | —               | 23,6       |
| 3. Nach v. FELLEBERG durch Fällung mit Jod . . . . .                      | —               | 14,6       |
| 4. Nach BAUMERT-BODE-WITTE . . . . .                                      | —               | 19,0       |
| 5. Nach EWERS polarimetrisch . . . . .                                    | 64,4            | 22,9       |
| 6. Nach EWERS mit anschließender Hydrolyse und Zuckerbestimmung . . . . . | 71,3            | —          |
| 7. Nach LINTNER-BELSCHNER (polarimetrisch) . . . . .                      | 65,4            | 19,5       |
| 8. Nach LEHMANN-SCHOWALTER (polarimetrisch) . . . . .                     | 66,0            | 20,7       |
| 9. Dasselbe mit Hydrolyse und Zuckerbestimmung . . . . .                  | 59,7            | 24,7       |
| 10. Inversionsverfahren mit Salzsäure . . . . .                           | 73,7            | —          |
| 11. Hydrolyse des mit Alkohol, Kalilauge erhaltenen Rückstandes . . . . . | 70,2            | 42,6       |

Hiernach liefern also alle übrigen der verglichenen Methoden, wie man besonders bei Kleie feststellen kann, höhere Ergebnisse als die nach v. FELLEBERG (3). Bei dem Verfahren nach BAUMERT-BODE-WITTE, sowie den polarimetrischen sind die Abweichungen verhältnismäßig am geringsten, bei den polarimetrischen besonders dann, wenn man die Werte noch um die Korrektur nach S. 921 für Weizenmehl mit 1%, für Kleie mit 3% vermindert. Die beschriebenen Diastaseverfahren dürften bei richtiger Ausführung ebenfalls genauere Ergebnisse liefern.

<sup>1</sup> A. v. ASBOTH: Repert. analyt. Chem. 1887, 7, 299.

<sup>2</sup> E. SEYFERT: Zeitschr. angew. Chem. 1888, 15.

<sup>3</sup> F. W. KÜSTER: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1895, 28, 783.

<sup>4</sup> M. DENNSTEDT u. F. VOIGTLÄNDER: Forschungsberichte über Lebensmittel 1895, 2, 173.

<sup>5</sup> H. WITTE: Z. 1903, 6, 625.

<sup>6</sup> H. ECKART: Chemie der Zellen und Gewebe 1925, 12, 243.

<sup>7</sup> Zu beziehen von Hellige & Co., in Freiburg i. Br.

<sup>8</sup> A. DIEM: Konserven-Ind. 1926, 13, 148; Z. 1930, 60, 351.

<sup>9</sup> K. ALPERS u. H. ZIEGENSPECK: Z. 1923, 45, 163.



## C. Bestimmung der Pentosane.

Unter Pentosanen sind die Anhydride der Pentagluosen oder Pentosen bzw. Methylpentosen zu verstehen; in praktischer Hinsicht pflegt man alle jene Stoffe als Pentosane zusammenzufassen, die bei der Destillation mit Salzsäure vom spezifischen Gewichte 1,06 Furfurol bzw. Methylfurfurol liefern<sup>1</sup>.

Hexosen und Hexosane liefern unter gleichen Bedingungen zunächst Oxymethylfurfurol (vgl. S. 852), das aber durch die heiße Salzsäure größtenteils zerstört wird.

Da sich die Pentosen auch ernährungsphysiologisch von den Hexosen verschieden verhalten, ist die Pentosanbestimmung in Lebensmitteln von erheblicher Bedeutung. Das erste Verfahren hierfür ausgearbeitet zu haben, ist das Verdienst von B. TOLLENS<sup>2</sup>. Wenn auch dieses Verfahren mit erheblichen Mängeln behaftet ist, auf die wir unten zurückkommen werden, so erfreut es sich doch heute noch internationaler Anwendung, weshalb es hier zunächst beschrieben sei.

### 1. Bestimmung der Gesamt-Pentosane.

#### a) Verfahren von B. TOLLENS.

Das Verfahren setzt sich aus zwei voneinander unabhängigen Behandlungen, nämlich einerseits der Überführung der Pentosane (bzw. Pentosen) durch Destillation mit Salzsäure in Furfurol, andererseits der Fällung des Furfurols im Destillat zusammen. Anfänglich verwendete TOLLENS zum Fällen des Furfurols Phenylhydrazin, später nach dem Vorschlage von COUNCLER<sup>3</sup> ausschließlich Phloroglucin, welches sich nach der Gleichung  $C_6H_6O_3 + C_5H_4O_2 = C_{11}H_6O_3 + 2H_2O$  umsetzt<sup>4</sup>, so daß sich verhält Phloroglucin:Phloroglucid = 126:186. Die Destillation ist bei beiden Verfahren gleich geblieben.

Es möge daher nur die von B. TOLLENS und M. KRÜGER<sup>5</sup> ausgebildete Bestimmung mit Phloroglucin hier beschrieben werden.

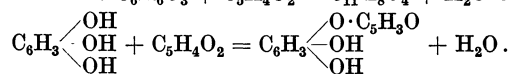
α) Destillation. 5 g der zu untersuchenden Substanz — bei pentosenreichen Stoffen 2–3 g — werden mit 100 ccm Salzsäure vom Spezifischem Gewicht 1,06 in einem etwa 300 ccm fassenden Kolben aus einem Bade von ROSESchem Metallgemisch (1 Teil Blei, 1 Teil Zinn, 2 Teile Wismut) destilliert, etwa in der nebenstehenden Destillationsvorrichtung (Abb. 10)<sup>6</sup>. Nachdem jedesmal 30 ccm abdestilliert sind, werden mittels einer Hahnpipette wieder 30 ccm derselben Salzsäure nachgefüllt, bis das Destillat nahezu 400 ccm erreicht hat und kein Furfurol mehr überdestilliert, was mit einer Lösung

<sup>1</sup> Da die Glucuronsäure- und Galakturonsäuregruppe ebenfalls Furfurol liefert, würden nur auf Grund dieses Verhaltens — auch die Pektinstoffe unter die Gruppe der „Pentosane“ fallen. Die Pektinstoffe werden jedoch besser als besondere Gruppe behandelt (vgl. S. 947).

<sup>2</sup> B. TOLLENS: Landw. Vers.-Stationen 1893, 42, 381 bzw. 398; Zeitschr. Ver. Deutsch. Rübenzuckerind. 44, 460; 46, 480; Journ. Landwirtsch. 1900, 48, 357.

<sup>3</sup> COUNCLER: Chem.-Ztg. 1894, 18, 966.

<sup>4</sup> Nach R. JÄGER u. E. ÜNGER: (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1903, 35, 4440) soll die Umsetzung, wie folgt, verlaufen:  $C_6H_6O_3 + C_5H_4O_2 = C_{11}H_6O_3 + H_2O$  oder



<sup>5</sup> B. TOLLENS u. M. KRÜGER: Diss. Rostock 1895; Zeitschr. Rübenzuckerind. 1896, 33, 21.

<sup>6</sup> Einen Destillieraufsatz, bei dem die doppelte Durchbohrung des Kautschukstopfers vermieden wird, hat J. TISCHTSCHENKO (Journ. Landwirtsch. 1909, 57, 229) angegeben. Vgl. auch S. 933.

von essigsauerm Anilin<sup>1</sup> festgestellt wird, indem 1 Tropfen hiervon auf Filtrierpapier mit dem Destillat zusammengebracht, keine Rotfärbung mehr zeigen darf<sup>2</sup>.

β) Fällung mit Phloroglucin. Das vorstehend erhaltene Destillat wird mit der doppelten Menge des zu erwartenden Furfurols an reinem<sup>3</sup> Phloroglucin versetzt, welches man vorher in Salzsäure vom Spezifischem Gewicht 1,06 gelöst hat; weiter wird so viel dieser Salzsäure zugefügt, daß das gesamte Volumen 400 ccm beträgt; man rührt wiederholt um, läßt bis zum folgenden Tage (15–18 Stunden) stehen, filtriert durch ein vorher bei 97–100° getrocknetes und in geschlossenem Kőlbchen gewogenes Filter oder durch einen Gooch-Porzellantiegel mit Asbestlage<sup>4</sup>, wäscht mit 150 ccm Wasser nach, trocknet dann 4 Stunden bei 98° und wägt.

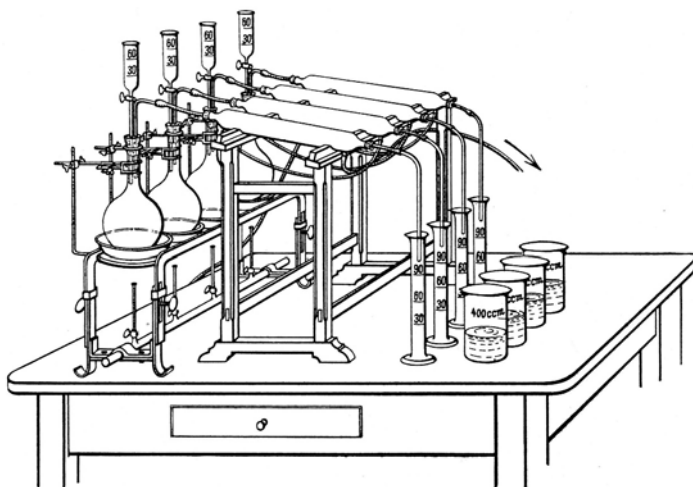


Abb. 10. Destillationsvorrichtung für die Bestimmung der Pentosen nach TOLLENS.

Das Phloroglucid muß nach TOLLENS und KRÖBER in geschlossenem Kőlbchen — oder im bedeckten Tiegel — gewogen werden, weil es sehr hygroskopisch ist. Bei zu langem Trocknen — 20 bis 24 Stunden — findet infolge Oxydation leicht eine Gewichtszunahme statt.

Um zu sehen, ob man bei der Fällung genügend Phloroglucin zugesetzt hat, prüft man die Lösung nach dreistündigem Stehen mit Anilinacetatpapier auf Furfurol, rührt, wenn das Papier gerötet wird, noch eine kleine Menge Phloroglucinlösung hinzu und prüft nach weiteren 3 Stunden abermals, bis keine Furfurolreaktion mehr auftritt.

Aus der Menge des gewogenen Niederschlages von Furfurol-Phloroglucin, dem Phloroglucid, berechnet man nach TOLLENS die Menge von Furfurol durch Division, wie folgt:

<sup>1</sup> Bei Methylpentosen wenig geeignet. — Hier nimmt man nach VAN DER HAAR besser Phloroglucin in Salzsäure.

<sup>2</sup> Nach VAN DER HAAR (Anleitung S. 65) bringt man zweckmäßig einen Tropfen der klaren Flüssigkeit auf Anilinacetatpapier und beobachtet, ob Rotfärbung eintritt.

<sup>3</sup> Das Phloroglucin puriss. E. MERCK enthält häufig noch geringe Mengen Diresorcine — erkennbar an der Violettfärbung, welche entsteht, wenn man eine kleine Menge des Präparates in 2–3 Tropfen Essigsäureanhydrid löst und mit 1–2 Tropfen konz. reiner Schwefelsäure versetzt. — Man kann das Phloroglucin durch häufiges Umkrystallisieren von Diresorcine reinigen (reinstes Phloroglucin schmilzt bei 205–210°, unreines bei 175° und niedriger), indes ist ein geringer Gehalt des Phloroglucins an Diresorcine nach TOLLENS ohne Einfluß auf das Ergebnis.

<sup>4</sup> Oder durch einen Glasfildertiegel.

| Erhaltene Phloroglucidmenge | Divisor für die Berechnung auf Furfurol | Erhaltene Phloroglucidmenge | Divisor für die Berechnung auf Furfurol | Erhaltene Phloroglucidmenge | Divisor für die Berechnung auf Furfurol |
|-----------------------------|---|-----------------------------|---|-----------------------------|---|
| 0,20 g                      | 1,820                                   | 0,30 g                      | 1,895                                   | 0,40 g                      | 1,920                                   |
| 0,22 g                      | 1,839                                   | 0,32 g                      | 1,904                                   | 0,45 g                      | 1,927                                   |
| 0,24 g                      | 1,856                                   | 0,34 g                      | 1,911                                   | 0,50 g                      | 1,930                                   |
| 0,26 g                      | 1,871                                   | 0,36 g                      | 1,916                                   | 0,60 g                      | 1,930                                   |
| 0,28 g                      | 1,884                                   | 0,38 g                      | 1,919                                   |                             |   |

Aus dem Furfurol berechnet man dann die betreffenden Pentosane oder Pentosen, wie folgt:

| Pentosane:   | Pentosen:   |
|--|---|
| (Furfurol — 0,0104) × 1,68 = Xylan,                | (Furfurol — 0,0104) × 1,91 = Xylose,              |
| (Furfurol — 0,0104) × 2,07 = Araban,               | (Furfurol — 0,0104) × 2,35 = Arabinose,           |
| (Furfurol — 0,0104) × 1,88 = Pentosane (allgemein) | (Furfurol — 0,0104) × 2,13 = Pentosen (allgemein) |

Zur einfachen Ablesung der Pentosen und Pentosane nach dieser Berechnung aus den gewogenen Phloroglucidmengen hat E. KRÖBER<sup>1</sup> eine ausführliche Tabelle berechnet. Ihre Anwendung sowie die Ausführung der vorstehenden Ausrechnung erübrigt sich jedoch nach C. KULLGREN und H. TYDÉN<sup>2</sup>, wenn man die gewogenen Phloroglucidmengen nach folgenden einfachen Formeln berechnet:

|                                  |                                    | Mittlerer Faktor: |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Xylose = 0,955 × Phloroglucid    | } Pentosen = 0,936 × Phloroglucid  | }                 |
| Arabinose = 1,172 × Phloroglucid |                                    |                   |
| Xylan = 0,840 × Phloroglucid     | } Pentosane = 0,936 × Phloroglucid | }                 |
| Araban = 1,031 × Phloroglucid    |                                    |                   |

So finden KULLGREN und TYDÉN:

Tabelle 21.

| Zucker-<br>menge<br>einge-<br>wogen<br>g | Phloro-<br>glucid<br>g | Xylose                           |                     | Phloro-<br>glucid<br>g | Arabinose                        |                     | Fehler der              |                      |                           |                      |
|--|------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
|  |                        | Einfache<br>Berech-<br>nung<br>g | Nach<br>KRÖBER<br>g |                        | Einfache<br>Berech-<br>nung<br>g | Nach<br>KRÖBER<br>g | einfachen<br>Berechnung |                      | Berechnung<br>nach KRÖBER |                      |
|  |                        |                                  |                     |                        |                                  |                     | Xylose<br>mg            | Arabi-<br>nose<br>mg | Xylose<br>mg              | Arabi-<br>nose<br>mg |
| 0,1000                                   | 0,1039                 | 0,0992                           | 0,0999              | 0,0850                 | 0,0996                           | 0,0996              | -0,8                    | -0,4                 | -0,1                      | -0,4                 |
| 0,1500                                   | 0,1571                 | 0,1500                           | 0,1484              | 0,1396                 | 0,1519                           | 0,1485              | 0                       | +1,9                 | -1,6                      | -1,5                 |
| 0,2000                                   | 0,2083                 | 0,1989                           | 0,1950              | 0,1728                 | 0,2025                           | 0,1960              | -1,1                    | +2,5                 | -5,0                      | -4,0                 |
| 0,2500                                   | 0,2617                 | 0,2499                           | 0,2436              | 0,2108                 | 0,2471                           | 0,2370              | -0,1                    | -2,9                 | -6,4                      | -13,0                |
| 0,3000                                   | 0,3188                 | 0,3044                           | 0,2954              | 0,2540                 | 0,2977                           | 0,2838              | +4,4                    | -2,4                 | -4,6                      | -16,2                |

Von einer Wiedergabe der Tabellen von KRÖBER kann somit abgesehen werden, da man durch die einfache Multiplikation mit obigen Faktoren genauere Ergebnisse erhält.

### b) Barbitursäureverfahren.

Die Mängel des Phloroglucidverfahrens wurden auch von anderen Bearbeitern erkannt und haben zu einer Reihe von Vorschlägen für andere Fällungsmittel des Furfurols geführt. So hat E. HOTTER<sup>3</sup> Pyrogallol vorgeschlagen. Besondere Vorteile bietet aber die von E. UNGER<sup>4</sup> zuerst empfohlene Barbitursäure, da diese Oxymethylfurfurol in den in Frage kommenden Konzentrationen nicht fällt und damit den Einfluß von Hexosen und Hexosanen auf das

<sup>1</sup> E. KRÖBER: Journ. Landwirtsch. 1900, 48, 357.

<sup>2</sup> C. KULLGREN u. H. TYDÉN: Über die Bestimmung von Pentosanen, Stockholm 1929, S. 24 u. 25.

<sup>3</sup> E. HOTTER: Chem.-Ztg. 1893, 17, 1743.

<sup>4</sup> R. JÄGER u. E. UNGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, 35, 4440.

Ergebnis völlig ausschließt. Hierdurch gewinnt die Bestimmung, wie auch Versuche von O. FALLADA, E. STEIN und J. RAVNIKAR<sup>1</sup> sowie von B. PETER, H. THALER und K. TÄUFEL<sup>2</sup> bestätigen, außerordentlich an Sicherheit und Genauigkeit.

Die Barbitursäure bildet mit Furfurol das Kondensationserzeugnis Furalbarbitursäure  $C_9H_6N_2O_4$  (s. Formel).

Aus dem Gewichte des Niederschlages berechnet sich der Gehalt an Furfurol mit dem Faktor

$$\text{Furfurol} = 0,4659 \times \text{Furalbarbitursäure.}$$

PETER, THALER und TÄUFEL verwenden zur Furfuroldestillation an Stelle der von TOLLENS angegebenen Vorrichtung ein Chlorcalcium- (100 g Wasser + 14 g  $CaCl_2$ ) oder Ölbad, das auf  $160^\circ$  eingestellt wird, oder noch besser einen Lufterhitzer gemäß nebenstehender Zeichnung. Dabei ist aber die Heizung so einzustellen, daß innerhalb 10–12 Minuten 30 ccm Destillat übergehen. Der Zulaufzylinder *a* fast 180 ccm 12%ige Salzsäure und besitzt eine nach unten fortgesetzte Träufelspitze zur Schonung des Kolbens.

Für die Ausführung des Versuches werden von der möglichst fein gepulverten, bei höherem Fettgehalt vorher entfetteten Substanz soviel in den Destillierkolben gegeben, als vermutlich 0,15 g Pentosan entspricht, dann unter Zugabe einiger kleiner Siedesteinchen 100 ccm 12%ige Salzsäure zugefügt, wobei darauf zu achten ist, daß der Schliff am Kolbenhals zwecks Dichtigkeit gut benetzt wird. Nun wird der Kolben mit Aufsatz in das vorher entsprechend erhitze Bad eingesetzt, mit dem absteigenden Kühler verbunden und auch dabei der Schliff etwas benetzt. Nachdem nun in etwa 10 bis 12 Minuten in den Auffangezylinder 30 ccm abdestilliert sind, werden aus dem Zulaufzylinder 30 ccm 12%ige Salzsäure in den Kolben nachfließen gelassen. Das Abdestillieren und Zugeben von Salzsäure wird solange wiederholt, bis die Menge des Destillates 210 ccm<sup>3</sup> beträgt. Nun wird, falls das Destillat (von Fettsäuren) getrübt sein sollte, durch ein kleines Papierfilter in ein 500 ccm-Becherglas filtriert und der Auffangezylinder zweimal mit je 10 ccm 12%iger Salzsäure nachgespült.

Nun gibt man zum Filtrat eine klare (nötigenfalls filtrierte), durch Erwärmen und folgendes Abkühlen bereitete, Lösung von 0,5 g Barbitursäure in 25 ccm 12%iger Salzsäure unter gutem Umrühren und läßt die stets etwas gelb gefärbte Flüssigkeit mindestens 18 Stunden bedeckt stehen. Dann filtriert man durch einen bei  $130^\circ$  konstant getrockneten Berliner Porzellan- (A 2) oder Jenaer-Glasfiltertiegel (I AG 3/5–7), spült die letzten Reste des Niederschlags mit dem Filtrat selbst

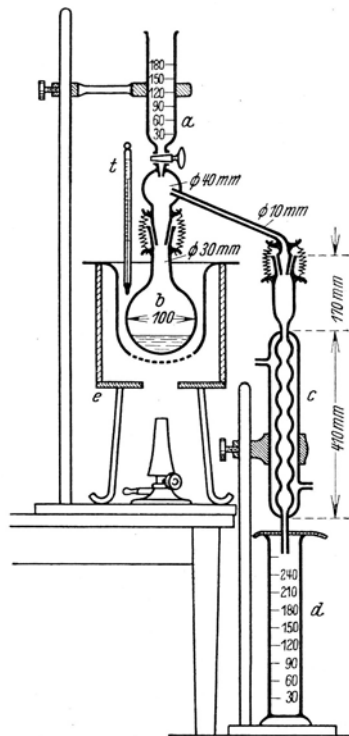
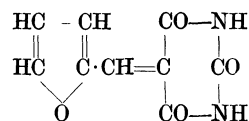


Abb. 11.  
Apparatur zur Pentosanbestimmung  
nach PETER, THALER und TÄUFEL.

<sup>1</sup> O. FALLADA, E. STEIN u. J. RAVNIKAR: Österr.-Ungar. Zeitschr. Zuckerind. 1914, 43, 425–432; Z. 1915, 29, 374.

<sup>2</sup> B. PETER, H. THALER und K. TÄUFEL: Z. 1933, 66, 143.

<sup>3</sup> Die bei weiterem Destillieren beim Verfahren von TOLLENS noch übergehenden Mengen Phloroglucid fällender Stoffe bestehen aus Spuren von Oxymethylfurfurol, nicht mehr als Furfurol oder Methylfurfurol.

in den Filtertiegel, füllt den Tiegel zum Auswaschen zweimal hintereinander mit destilliertem Wasser und saugt die Flüssigkeit scharf ab. Dann wird bei 130° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und zur Vermeidung einer Wasseranziehung in verschließbaren Schutzgläsern oder verschraubbaren Aluminiumbechern gewogen.

Ist N die Menge des Niederschlages, L das Gesamtvolumen der Fällungsflüssigkeit (etwa 255 ccm), so findet man mit W. GIERISCH<sup>1</sup> Furfurol = 0,4659 (N + 0,0000122 L) g.

Statt einer Umrechnung auf Pentosen oder Pentosane mit den von TOLLENS (S. 930) angegebenen Faktoren empfehlen PETER, THALER und TÄUFEL die genauere Angabe als Furfurol ohne Umrechnung, bezogen auf 100 g Substanz (Furfurolwert).

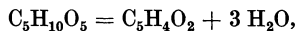
Nach besonderen Versuchen von PETER, THALER und TÄUFEL treten bei Anwesenheit von Galaktose oder Mannose bzw. bei aus diesen Zuckerarten zusammengesetzten Verbindungen Furfurolverluste, vermutlich durch Bildung von Huminstoffen bei der Einwirkung der heißen Salzsäure ein.

Nach A. W. DOX und G. P. PLAISANCE<sup>2</sup> ist die Thiobarbitursäure als Fällungsmittel der Barbitursäure noch vorzuziehen. Man erhält damit einen voluminösen leicht filtrierbaren Niederschlag und kann so noch 12 mg Furfurol bestimmen. Auch C. KULLGREN und H. TYDÉN<sup>3</sup> ziehen die Thiobarbitursäure zur Ausfällung von Furfurol vor, ebenso H. A. IDDLÉS und P. J. ROBBINS<sup>4</sup>, die damit bei reinem Furfurol 100,17—101,54% wiederfinden. Festzustellen ist aber noch, ob auch Oxymethylfurfurol durch Thiobarbitursäure ebenso wie durch Barbitursäure nicht in störendem Maße mitgefällt wird. H. ASPELUND und F. W. KLINGSTEDT<sup>5</sup> beseitigen das Oxymethylfurfurol zunächst durch abermalige Destillation und fällen dann erst mit Thiobarbitursäure.

J. TH. FLOHL<sup>6</sup> hat eine Vorschrift zur Bestimmung des Furfurols mit FEHLINGScher Lösung angegeben, während N. C. PERVIER und R. A. GÖRTNER<sup>7</sup> es mit Kaliumbromat ermitteln.

### c) Verfahren von C. KULLGREN und H. TYDÉN<sup>8</sup>.

Diese fanden, daß die Zersetzung des Furfurols bei der Destillation mit Salzsäure unabhängig von der Menge des Furfurols, aber abhängig von der Destillationsgeschwindigkeit ist. Das gleiche gilt für das aus Pentosen oder Pentosanen entstehende Furfurol; dabei entspricht die gebildete Furfurolmenge nicht der Umsetzungsgleichung



sondern ist stets geringer und für Arabinose und Xylose verschieden. Bei Verwendung einer 13,15%igen mit Natriumchlorid gesättigten Salzsäure, deren Konzentration bei der Destillation konstant bleibt, erhielten KULLGREN und TYDÉN von den angewendeten Mengen Xylose, Arabinose und Rhamnose konstante Ausbeuten an Furfurol und Methylfurfurol und dabei den Vorteil einer doppelt so schnellen Destillation, wobei die Verluste an Furfurol bei einer Destillation auf etwa 3% vermindert werden konnten. Das Furfurol selbst ließ sich durch Titration mit Bromat genau bestimmen, durch freies Brom wird es nämlich in schwach sauren Lösungen unter gleichzeitiger Bildung von 2 Mol Bromwasserstoffsäure sehr schnell oxydiert. Dann folgt langsam eine Bromsubstitution, die man durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen praktisch vermeidet. Weiter fanden KULLGREN und TYDÉN, daß das aus

<sup>1</sup> W. GIERISCH: Cellulosechemie 1925, 6, 89.

<sup>2</sup> A. W. DOX and G. P. PLAISANCE: Journ. Amer. Chem. Soc. 1916, 38, 2156—2164; C. 1917, 1, 172.

<sup>3</sup> C. KULLGREN u. H. TYDÉN: Über die Bestimmung von Pentosanen, S. 49.

<sup>4</sup> H. A. IDDLÉS u. P. J. ROBBINS: Ind. Engin. Chem. Analyt. Edition 1933, 5, 55.

<sup>5</sup> H. ASPELUND u. F. W. KLINGSTEDT: Pappers-Trävarutidskr. Finland 1933, 682; C. 1934, I, 314.

<sup>6</sup> J. TH. FLOHL: Chem. Weekbl. 1910, 7, 1057; Z. 1911, 22, 415.

<sup>7</sup> N. C. PERVIER and R. A. GÖRTNER: Journ. Ind. Engin. Chem. 1923, 15, 1167, 1225; Z. 1926, 52, 487.

<sup>8</sup> C. KULLGREN u. H. TYDÉN: Über die Bestimmung von Pentosanen. Besondere Schrift. Stockholm 1929.

Hexosen und Polyosen bei der Salzsäuredestillation entstehende Oxymethylfurfurol leicht durch nochmalige Destillation bis auf vernachlässigbare Spuren zerstört werden kann, während die Furfurolmenge bis auf die genannten 3% erhalten bleibt.

Das Methylfurfurol aus Methylpentosen verbraucht wesentlich mehr Bromat als das Furfurol. Beim Umdestillieren wird jedoch fast genau soviel (etwa 33%) Methylfurfurol zersetzt, wie diesem Mehrverbrauch entspricht, so daß man mit der folgenden Berechnungsformel für Pentosane richtige Werte auch für Methylpentosane erhält. Spuren von Formaldehyd, die bei der Salzsäuredestillation aus Lignin frei werden können und bei dem Verfahren nach TOLLENS störend wirken, sind auf das vorliegende Verfahren ohne Einwirkung. Die etwa aus Sulfitzellstoff in das Destillat übergehenden Mengen schwefliger Säure werden durch Titration mit Jod ermittelt und in Rechnung gesetzt; im übrigen sind sie auf die Furfurolbestimmung ohne Einfluß.

#### Beschreibung des Verfahrens.

α) Bei Pentosen, Pentosanen oder Methylpentosen (Rhamnose), Methylpentosan (Rhamnosan). In einen Destillationskolben von 300 ccm Inhalt mit eingeschliffenem Aufsatz (Abb. 12) bringt man soviel des Kohlenhydrates als 0,15–0,20 g Xylose oder Rhamnose bzw. 0,20–0,30 g Arabinose entspricht. Dazu gibt man 100 ccm 13,15%ige Salzsäure (D. 1,065) und 19–20 g Natriumchlorid. Erhitzt wird auf einem BABO-Blech durch Brenner mit Regulierschraube. Die Destillation wird so geleitet, daß in 10 Minuten nach beginnendem Kochen 25 ccm Destillat übergegangen sind. Dann werden 25 ccm neue Säure der genannten Konzentration aus dem Trichter zugesetzt, wieder 25 ccm überdestilliert und so fort-

gefahren. Bei Xylose läßt man etwa 250 ccm (also in 100 Minuten), bei Arabinose 350 ccm (also in 140 Minuten) insgesamt überdestillieren. Darauf gibt man die Destillate in einen Meßkolben von 250 bzw. 400 ccm, füllt mit der 13,15%igen Salzsäure zur Marke auf und mischt. Aus jedem Kolben werden mit der Pipette zwei Proben von je 100 ccm entnommen und in 500 ccm ERLLENMEYER-Kolben gegeben, die mit Stopfen verschlossen werden. Unter Kühlung setzt man dann 200 ccm 1,58 N.-Natronlauge zu und kühlt weiter bis auf Zimmertemperatur (18–19°) ab. Dann werden 10 ccm einer Ammoniummolybdatlösung (25 g des Salzes im Liter) und darauf 25 ccm einer 0,05 N.-Bromatbromidlösung, die im Liter 1,392 g Kaliumbromat und 10 g Kaliumbromid enthält, zugefügt. Die Probe hält man dann gegen eine weiße Unterlage und stellt den Zeitpunkt fest, in dem eine Gelbfärbung eben zu erkennen ist, was in 0–2 Minuten, meist in  $\frac{1}{4}$  Minute eintritt<sup>1</sup>. Von diesem Zeitpunkt an muß die Probe 4 Minuten stehen. Dann gibt man etwa 1 g festes Kaliumjodid hinzu, schüttelt um, läßt

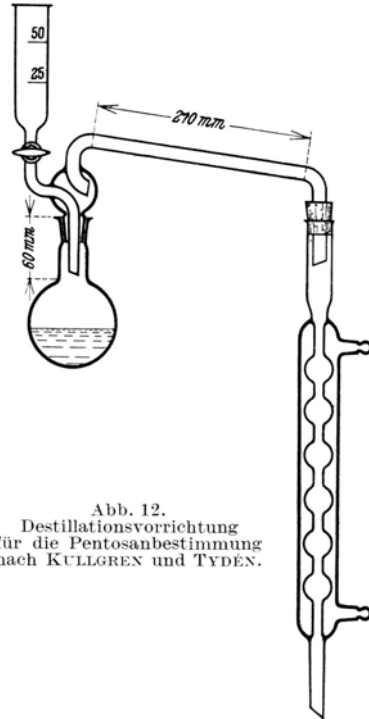


Abb. 12.  
Destillationsvorrichtung  
für die Pentosanbestimmung  
nach KULLGREN und TYDEN.

<sup>1</sup> Ein Irrtum dabei bis zu  $\frac{1}{2}$  Minute bedingt noch keinen größeren Fehler.

wieder 5—10 Minuten stehen und titriert in üblicher Weise mit 0,05 N.-Thio-sulfatlösung gegen Stärke als Indicator.

Der Bromatverbrauch für jede Titration ergibt sich aus der zugesetzten Volummenge an Bromatlösung, vermindert um die verbrauchte Raummenge Thiosulfatlösung. Das Ergebnis, mal 2,5 bei Xylose bzw. mal 4 bei Arabinose und Rhamnose, liefert den gesamten Bromatverbrauch  $n$  in ccm 0,05 N.-Bromat-lösung. Hieraus erhält man, bezogen auf den im Destillat befindlichen Teil<sup>1</sup>, an Furfurol:

|  |               |                       |               |
|--|---------------|-----------------------|---------------|
| Furfurol                               | = 0,00240 $n$ | Xylan                 | = 0,00374 $n$ |
| Xylose                                 | = 0,00425 $n$ | Araban                | = 0,00445 $n$ |
| Arabinose                              | = 0,00506 $n$ | Pentosane (allgemein) | = 0,00410 $n$ |
| Rhamnose ( $C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$ ) | = 0,00346 $n$ | Rhamnosan             | = 0,00278 $n$ |

$\beta$ ) Pentosen oder Pentosane in Gegenwart von Hexosen und Polyosen; Rhamnosan in Gegenwart von Stoffen aus einer dieser vier Gruppen<sup>2</sup>. Von dem zu prüfenden Stoff wird soviel eingewogen, wie voraussichtlich 0,075—0,100 g Furfurolausbeute entspricht. Die Destillation erfolgt wie nach  $\alpha$ . In einigen Fällen eintretende Schaumbildung ist durch kurze Unterbrechung der Flamme unter dem BABO-Blech leicht zu bekämpfen. Auch Holz oder Zellstoff aus Fichtenholz braucht bei genügend feiner Vermahlung nicht länger als 100 Minuten (entsprechend 250 ccm Destillat) destilliert zu werden.

Zum Destillat fügt man 2 ccm (bei 350 ccm Destillat:3 ccm) Salzsäure von der Dichte 1,19, worauf in gleicher Weise wie bei  $\alpha$  mit 13,15%iger Salzsäure zur Marke aufgefüllt wird. Vom Destillat werden 100 ccm<sup>3</sup> in das inzwischen entleerte Destillationskölbchen oder ein anderes von gleicher Art gegeben, 19—20 g Natriumchlorid hinzugefügt und ebenso wie früher (also unter Zusatz neuer Säure, sobald 25 ccm überdestilliert sind) nun weiter verfahren, bis schließlich 100 ccm Destillat vorliegen. Das Destillat wird in einen ERLÉNMEYER-Kolben gegeben, die Säure wie oben abgestumpft, und das Furfurol in derselben Weise wie bei  $\alpha$  titriert. Zu beachten ist dabei nur, daß das Bromat im Überschuß vorhanden ist.

Die Berechnung erfolgt wieder wie unter  $\alpha$  doch mit dem Zusatz, daß man für die zweite Destillation zu dem für Xylose usw. gefundenen Werten 3,1% (Faktor 1,031) hinzugefügt. Bei Vorliegen von Rhamnosan ist die Berechnungsformel für Pentosane (allgemein) anwendbar; man erhält damit die Summe Rhamnosan + Pentosane.

$\gamma$ ) Bei Sulfitzellstoff kann man nach  $\beta$  verfahren, wenn der Sulfitgehalt nur gering ist. Im anderen Falle destilliert man nach  $\beta$  zunächst 250 ccm, dann abermals 100 ccm, die man in einen 150 ccm-Meßkolben gibt und mit 13,15%iger Salzsäure zur Marke auffüllt. Davon titriert man 100 ccm nach  $\alpha$  auf Bromatverbrauch. Zu den restlichen 50 ccm gibt man zunächst 100 ccm 1,58 N.-Natronlauge, dann 10 ccm 0,05 N.-Jodlösung und läßt ebenso lange wie die Bromatprobe, gerechnet vom Zeitpunkt des Bromatzusatzes an, bis zur Titration mit Thiosulfatlösung stehen. Ein so eintretender Jodverbrauch entspricht der Menge an freiem Schwefeldioxyd in der Probe. Den dem Furfurol im zweiten Destillat entsprechenden Bromatverbrauch erhält man nach der Formel:  $\frac{3}{2} \times$  gefundenen Bromatverbrauch minus  $0,5 \times 3 \times$  Jodverbrauch. Daraus erhält man den Bromatverbrauch der ganzen Probe und die entsprechende Pentosanmenge nach  $\alpha$ , unter Berücksichtigung der Korrektur nach  $\beta$ .

## 2. Bestimmung der Methylpentosane.

Um die bei der Destillation von organischen Stoffen mit Salzsäure von 1,06 spezifischem Gewicht erhaltenen Flüssigkeiten qualitativ auf die

<sup>1</sup> Für die Berechnung auf die ursprüngliche Probe multipliziert man die Zahlen noch mit 1,031, entsprechend der beim Kochen zersetzten Furfurolmenge.

<sup>2</sup> Auch Natron- oder Sulfitzellstoff wird nach dieser Vorschrift untersucht.

<sup>3</sup> Am besten 2 solche Proben um Doppelanalysen zu erhalten.

Gegenwart von Methylfurfurol — entstanden aus Methylpentosanen bzw. Methylpentosen — zu prüfen, vgl. S. 855.

Zur Bestimmung der Methylpentosane neben Pentosanen ist gewöhnlich der von VOTOČEK<sup>1</sup> angegebene Unterschied, daß das Furfurolphloroglucid in Alkohol unlöslich, das Methylfurfurolphloroglucid dagegen hierin leicht löslich ist, verwendet worden. B. TOLLENS und W. B. ELLET<sup>2</sup> bestimmen die Gesamtmenge Phloroglucid durch Sammeln im GOOCH-Tiegel, Trocknen und Wägen. Die Tiegel werden dann in kleine Bechergläschen gesetzt, und in die Tiegel wird 15–20 ccm Alkohol von 95 Vol.-% gegossen; die Bechergläschen werden auf einem Wasserbade ungefähr 10 Minuten auf etwa 60° erwärmt, die Tiegel alsdann auf eine Saugvorrichtung gebracht und der Inhalt damit abgesogen. Bei Anwesenheit von Methylfurfurol-Phloroglucid ist die alkoholische Lösung braun gefärbt. Der Tiegel wird nach dem Absaugen des Inhaltes wieder in das Bechergläschen zurückgebracht und die Behandlung mit Alkohol 2–3mal, d. h. solange wiederholt, bis der Alkohol farblos abfließt; darauf wird der Tiegel 2 Stunden im Wassertrockenschrank getrocknet, gewogen, zur Veraschung geglüht und wieder gewogen. Die Differenz zwischen den Gewichten vor und nach der Veraschung gibt die Menge Furfurol-Phloroglucid, die Differenz zwischen den Gewichten des Tiegels vor und nach der Behandlung mit Alkohol die Menge des Methylfurfurol-Phloroglucids. Aus der Menge Furfurol-Phloroglucid berechnen TOLLENS und ELLET nach S. 929 die Menge Pentosen bzw. Pentosane, aus der Menge Methylfurfurol-Phloroglucid (Ph) die Menge Methylpentose (Rhamnose) nach folgender Gleichung:

$$\text{Rhamnose} = 1,65 \text{ Ph} - 1,84 \text{ Ph}^2 + 0,010.$$

Statt dieser Gleichung empfehlen KULLGREN und TYDÉN die einfachere Formel:

$$\text{Rhamnose} = 0,00346 n,$$

worin wie auf S. 934 n den Bromatverbrauch in Kubikzentimeter 0,05 N.-Lösung bedeutet. Das Rhamnosan erhält man aus der Rhamnose mit dem Faktor 0,8, also

$$\text{Rhamnosan} = 0,8 \cdot 0,00346 n = 0,00278 n.$$

SCHORGER<sup>3</sup> hat gefunden, daß auch das Phloroglucid des Furfurols in Alkohol nicht ganz unlöslich ist. Außerdem ist nach F. W. KLINGSTEDT<sup>4</sup> Oxymethylfurfurolphloroglucid mehr oder weniger schwerlöslich in Alkohol. Durch einfache Behandlung mit Alkohol ist also eine befriedigende Trennung dieser Phloroglucide nicht möglich. Wahrscheinlich sind nach KULLGREN und TYDÉN in vielen Fällen, in denen in der Literatur über das Vorkommen von Methylpentosanen berichtet worden ist, nicht daraus erhaltene Phloroglucide, sondern Oxymethylfurfurolphloroglucid, entstanden aus Hexosen, durch die Behandlung mit Alkohol abgetrennt und als Methylfurfurol-Phloroglucid bestimmt worden. Jedenfalls dürfte es erforderlich sein, bei der Prüfung auf Methylfurfurol durch Behandlung der Phloroglucide mit Alkohol das Oxymethylfurfurol vorher durch Umdestillation, wie oben (S. 932) gezeigt wurde, zu entfernen. Vielleicht ist es auch möglich, Methylfurfurol neben Furfurol auf Grund der verschiedenen Zerfallskonstanten beider Stoffe bei der Destillation mit Salzsäure zu bestimmen.

<sup>1</sup> VOTOČEK: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 1195.

<sup>2</sup> B. TOLLENS u. W. B. ELLET: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, **37**, 492; Journ. Landwirtsch. 1905, **53**, 13. — Das Verfahren wurde von VAN DER HAAR (Anleitung, S. 68—69) mit günstigen Ergebnissen nachgeprüft.

<sup>3</sup> Nach KULLGREN und TYDÉN.

<sup>4</sup> F. W. KLINGSTEDT: Zeitschr. analyt. Chem. 1925, **66**, 129; C. 1925, II, 479.



### 3. Begriff und Bestimmung der Proto- und Hemi-Hexosane und -Pentosane.

Nach den Untersuchungen von J. KÖNIG<sup>1</sup> sind in der Zellmembran neben der eigentlichen Cellulose, die er Orthocellulose nennt, und dem eigentlichen Lignin, das er mit Ortholignin bezeichnet, biologisch jüngere Stoffe auf- und angelagert, die von ihm Proto- und Hemi-Hexosane (Hemicellulose) bzw. Proto- und Hemipentosane bzw. Proto- und Hemilignine genannt werden. Ebenso können die Pentosane stufenweise in Proto-, Hemi- und Orthopentosane unterschieden werden.

In analytischer Hinsicht versteht KÖNIG unter Protoverbindungen solche, die von der Zellwand am leichtesten, nämlich bereits durch Dämpfen mit Wasser, durch Diastase oder 1%ige Pepsin-Salzsäure in Lösung gehen; sie sind als die jüngsten Teile der Zellwand anzusehen. Die Hemiverbindungen gehen dagegen erst durch Kochen mit 2–3%iger Säure, oder Dämpfen damit in Lösung. Die Proto- und Hemi-hexosane, zu denen auch die Stärke (S. 912) zu zählen ist, bilden im Verein mit den Proto- und Hemipentosanen den Hauptbestandteil der sog. stickstofffreien Extraktstoffe (vgl. S. 835).

Für die Untersuchung und Bestimmung der genannten, in 2%iger Salzsäure löslichen, Stoffe bringt KÖNIG<sup>2</sup> die mit Äther und Wasser ausgezogenen, getrockneten und gewogenen Rückstände von 5 g des Untersuchungsgegenstandes quantitativ in 300–400 ccm fassende Kolben, fügt 200 ccm 2%ige Salzsäure hinzu und kocht 3 Stunden am Rückflußkühler. Die Mischung wird dann durch einen gewogenen Glasfiltertiegel (Schott & Gen. 2 G3, Form 2) filtriert, der Rückstand im Tiegel erst mit Wasser, dann mit etwas Alkohol und Äther ausgewaschen, bei 105° bis zur Gewichtsbeständigkeit getrocknet und gewogen. Diese Wägung vermindert um die des mit Wasser ausgezogenen Rückstandes ergibt die Gesamtmenge der durch 2%ige Salzsäure gelösten Stoffe.

Bestimmt man nun weiter in der erhaltenen Lösung auf übliche Weise Proteine + Mineralstoffe + Pentosane, addiert zu dieser Summe die nach EWERS (S. 920) in dem Untersuchungsgegenstand direkt ermittelte Stärke, und zieht das Ergebnis von der Gesamtmenge der in Lösung gegangenen Stoffe ab, so findet man die Menge der Proto- und Hemi-hexosane<sup>3</sup>.

## IV. Bestimmung der Bestandteile der Zellmembran.

### A. Bestimmung der Rohfaser.

Unter Roh- oder Holzfaser versteht man den bei einer bestimmten Behandlung der Futter- und Nahrungsmittel mit verdünnten Säuren und Alkalien von bestimmtem Gehalt verbleibenden Rückstand.

Schon aus dieser Definition geht hervor, daß wir es in der Rohfaser nicht mit einer einheitlichen Substanz, etwa Cellulose, zu tun haben, wie der Rückstand vielfach bezeichnet worden ist. Er bildet vielmehr nur den unlöslicheren bzw. schwerlöslichen Teil der Zellmembran.

Um den Wert der verschiedenen für die Bestimmung der Rohfaser in Vorschlag gebrachten Verfahren beurteilen zu können, muß man wieder folgende Eigenschaften der Bestandteile der Zellmembran<sup>4</sup> beachten:

<sup>1</sup> Vgl. J. KÖNIG u. E. RUMP: Z. 1914, 28, 177; vgl. auch S. 835.

<sup>2</sup> J. KÖNIG: Z. 1930, 59, 564.

<sup>3</sup> Einschließlich des Proto- und Hemilignins, das hier von KÖNIG nicht erwähnt wird. — Vielleicht ist es möglich auf Grund der Reduktionswerte gegen FEHLINGSche Lösung auch dessen Menge festzustellen.

<sup>4</sup> Vgl. S. 835.

1. Die Proto- und Hemicellulosen (Hexosane und Pentosane), die durch verdünnte Mineralsäuren hydrolysiert und gelöst werden. Ebenso geht bei dieser Hydrolyse ein Teil der Lignine, von J. KÖNIG<sup>1</sup> Proto- und Hemicellulose genannt, in Lösung.

2. Von den Inkrusten sind:

a) die Bitter-, Gerb-, Farb- und Pektinstoffe, die gummi- und schleimgebenden Stoffe, die aromatischen Aldehyde (Hadromal, Coniferin und Vanillin) ebenfalls in Säuren oder in verdünntem Alkali löslich;

b) die esterartigen Verbindungen Cutin und Suberin<sup>2</sup> löslich in Alkali, dagegen unlöslich in Kupferoxydammoniak;

c) die eigentlichen Lignine — Ortholignine, gefärbt und ungefärbt, oxydierbar durch schwache Oxydationsmittel und auf diese Weise trennbar von der wahren Cellulose.

Qualitativ wird Lignin in pflanzlichen Stoffen z. B. unter dem Mikroskop an der mit einer 1%igen Lösung von Phloroglucin in konzentrierter Salzsäure eintretenden Rotfärbung erkannt. Um die lästige Anwendung der starken Salzsäure zu umgehen, läßt W. PLAHL<sup>3</sup> die Schnitte in wenigen Tropfen einer Mischung von gleichen Teilen 2,5%iger alkoholischer Phloroglucinlösung mit wäßriger Chloralhydratlösung (5:2), der 4% 25%ige Salzsäure zugesetzt sind, auf einem Uhrglase etwas 30 Minuten liegen und beobachtet dann in Chloralhydrat. Die Rotfärbung der verholzten Stellen setzt in dem Reagens in etwa 5 Minuten ein und nimmt dann weiter zu.

Ein anderes Reagens auf verholzte Membranen ist nach W. PEYER<sup>4</sup> Kobaltrhodanid. Zur Herstellung löst man 9 g Kobaltonitrat in 6 g Wasser und andererseits 2,5 g Kaliumrhodanid in 2,5 g Wasser. Beide Lösungen werden gemischt und dabei ausfallende kleine Krystallmengen durch vorsichtigen Zusatz von Wasser in Lösung gebracht. Verholzte Membranen färben sich in dem Reagens sofort prächtig blau, bisweilen grünstichig; die Färbung verschwindet aber bei Zusatz von Wasser und läßt sich dann mit neuem Reagens wieder hervorrufen. Nach PEYER handelt es sich bei der Reaktion, die empfindlicher ist als die mit Phloroglucin-Salzsäure, um eine Adsorptionerscheinung. — Stärke und Eiweißkrystalle der Aleuronkörner werden zwar ebenfalls gefärbt, jedoch nicht so stark, daß dadurch eine Störung entsteht.

3. Die wahre Cellulose (bzw. die Cellulosen) unlöslich in verdünnten Säuren und Alkalien, unoxydierbar durch schwache Oxydationsmittel, dagegen löslich in konz. Mineralsäuren und Kupferoxydammoniak (oder auch in einer Lösung von Zinkchlorid in der zweifachen Gewichtsmenge von Essigsäureanhydrid). Diesen Teil nennt KÖNIG Orthocellulose, soweit er durch Anhydrisierung von Hexosen, Orthopentosane, soweit er durch Anhydrisierung von Pentosen entstanden ist.

Mit Jod färbt sich Cellulose nur braun oder gelb. Fügt man aber bestimmte Quellmittel wie Jodwasserstoff, Jodzink, Chlorzink, Schwefelsäure, Phosphorsäure hinzu, so wird sie durch Jod blau gefärbt. Am besten eignet sich zur Prüfung Chlorzinkjodlösung<sup>5</sup>. Für eine mikroskopische Prüfung wird die Probe mit schwacher Jodlösung durchfeuchtet und dann reine konzentrierte Schwefelsäure hinzugesetzt, worauf Blaufärbung eintritt.

Die Lignine unterscheiden sich von der Cellulose (mit 44,4% C) und den Pentosanen (mit 45,5% C) auch durch einen bedeutend höheren Kohlenstoffgehalt (etwa 68—70% C), der nur durch Annahme ringförmig geschlossener Kohlenstoffverbindung erklärt werden kann.

Nach diesen Eigenschaften der Bestandteile der Zellmembran gegen Lösungs- und Oxydationsmittel lösen die zur Bestimmung der Rohfaser vorgeschlagenen Verfahren ihre

<sup>1</sup> Vgl. J. KÖNIG u. W. SUTTHOFF: Landw. Vers.-Stationen 1909, 70, 343.

<sup>2</sup> Cutin und Suberin sind wachsartige Ester mit dem Kohlenstoffgehalt von 68—74%. Von beiden ist das Cutin verseifbar, das Suberin nicht.

<sup>3</sup> W. PLAHL: Z. 1931, 62, 603.

<sup>4</sup> W. PEYER: Apoth.-Ztg. 1929, 44, 334.

<sup>5</sup> Man löst in 100 g Chlorzinklösung vom spezifischen Gewicht 1,86 g Kaliumjodid und sättigt diese Lösung mit Jod.

Aufgabe in verschiedenem Grade und Sinne, wie auch durch besondere Untersuchungen der Rohfaser selbst bestätigt worden ist. Das allgemein eingeführte Verfahren von W. HENNEBERG und FR. STOHMANN (sog. Weender Verfahren, 1864) hat den Mangel, daß die 1 $\frac{1}{4}$ %ige Schwefelsäure, wie die Untersuchungen von TOLLENS und DÜRING<sup>1</sup>, J. KÖNIG<sup>2</sup> und O. KELLNER<sup>3</sup> nachgewiesen haben, nicht alle Hemicellulosen, wenigstens bei weitem nicht alle Pentosane, löst, während durch die 1 $\frac{1}{4}$ %ige Kalilauge ein Teil der Lignine und ohne Zweifel auch des Cutins gelöst wird. Durch das Verfahren von F. SCHULZE<sup>4</sup> (Behandeln der mit Wasser, Alkohol und Äther ausgezogenen Pflanzenstoffe mit Kaliumchlorat, Salpetersäure und Auswaschen des Rückstandes mit verdünntem Ammoniak) erhält man zwar eine kohlenstoffärmere (ligninärmere) Rohfaser, aber nach den Untersuchungen von TOLLENS und DÜRING<sup>5</sup>, sowie von E. SCHULZE<sup>6</sup> enthält diese Rohfaser noch erhebliche Mengen Pentosane<sup>7</sup>. Dasselbe ist nach TOLLENS und DÜRING der Fall bei den Rohfasern, die entweder nach dem Verfahren von M. HÖNIG<sup>8</sup> (Erhitzen der Substanz mit Glycerin bei 210°), oder nach dem Verfahren von GABRIEL<sup>9</sup> (Erhitzen der Substanz mit Glycerin, Kalilauge auf 180°), oder nach dem Verfahren von G. LEBBIN<sup>10</sup> (Oxydation der Substanz mit Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak) erhalten werden. Andere Verfahren zur Bestimmung der Rohfaser, so das von W. HOFFMEISTER<sup>11</sup> (Behandeln der mit Wasser und Alkohol ausgezogenen Substanz mit der fünffachen Menge von Eisessig bei 88—92° und Ausziehen des Rückstandes mit Kupferoxydammoniak bzw. Behandeln der Substanz mit 5%iger Natronlauge und Ausziehen des Rückstandes mit Kupferoxydammoniak), oder von G. LANGE<sup>12</sup> (Behandeln der Substanz mit Ätzkali bei 180°), oder das von ZEISEL und STRITAR<sup>13</sup> (Oxydation der Substanz mit Kaliumpermanganat und verdünnter Salpetersäure) haben sich insofern nicht bewährt, als hierdurch auch die wahre Cellulose angegriffen wird oder die anderen Bestandteile der Rohfaser nicht quantitativ mitbestimmt werden können. H. LOHRISCH<sup>14</sup> schlägt vor, 5 g Substanz mit 50%iger Kalilauge zu behandeln, mit Wasserstoffsuperoxyd aufzuhellen, die Lösung mit dem gleichen Volumen Alkohol zu versetzen, um gelöste Cellulose wieder auszufällen usw. Das Verfahren erscheint aber von vornherein für alle stärkehaltigen Stoffe unbrauchbar, weil mit der Cellulose auch gelöste Stärke durch den Alkohol ausgefällt wird. Einen tabellarischen Überblick über die verschiedenen bisherigen Vorschläge zur Rohfaser- oder Cellulosebestimmung, die Ausbeuten bei Baumwolle, Sulfitzellstoff, Fichtenholz, Jute, den Lignin- und Pentosangehalt der Produkte sowie ihre Kupferzahl nach SCHWALBE-HÄGGLUND geben A. KÜRSCHNER und A. HOFFER<sup>15</sup>.

Von einem Verfahren zur Bestimmung der Rohfaser muß aber nach der Vervollkommnung der Futter- und Nahrungsmittelanalyse durch B. TOLLENS in erster Linie verlangt werden, daß sie eine tunlichst pentosanfreie Rohfaser liefert. Denn, wenn bei einer eingehenden Untersuchung der Nahrungs- und Futtermittel die Bestimmung der Pentosane<sup>16</sup> ausgeführt wird, so werden die Pentosane, falls noch ein erheblicher Bestandteil bei der zu bestimmenden Rohfaser verbleibt, in der Analyse doppelt zum Ausdruck gelangen, einmal für sich allein und dann wieder in der Rohfaser. Eine pentosanfreie oder möglichst pentosarme Rohfaser erhält man aber nach dem Verfahren von J. KÖNIG<sup>17</sup> (Behandeln der Substanz mit Glycerin-Schwefel-

<sup>1</sup> TOLLENS u. DÜRING: Journ. Landwirtsch. 1897, 45, 79; 1901, 49, 11.

<sup>2</sup> J. KÖNIG: Z. 1898, 1, 1; 1903, 6, 769.

<sup>3</sup> O. KELLNER: Ebendort 1899, 2, 784.

<sup>4</sup> F. SCHULZE: Chem. Zentralbl. 1857, 351.

<sup>5</sup> TOLLENS u. DÜRING: Journ. Landwirtsch. 1897, 45, 79.

<sup>6</sup> E. SCHULZE: Zeitschr. physiol. Chem. 1892, 16, 430, 433.

<sup>7</sup> W. HOFFMEISTER hat das Oxydationsgemisch von FR. SCHULZE durch Salzsäure und chlorsaures Kalium ersetzt, wodurch aber die wahre Cellulose ebenfalls stark angegriffen wird.

<sup>8</sup> M. HÖNIG: Chem.-Ztg. 1899, 14, 868, 905.

<sup>9</sup> GABRIEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1892, 16, 270.

<sup>10</sup> G. LEBBIN: Arch. Hygiene 1897, 28, 214.

<sup>11</sup> W. HOFFMEISTER: Landw. Jahrb. 1888, 17, 214; 1889, 18, 767; Landw. Vers.-Stationen 1891, 39, 461.

<sup>12</sup> G. LANGE: Zeitschr. physiol. Chem. 1890, 14, 283.

<sup>13</sup> ZEISEL u. STRITAR: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, 35, 1254.

<sup>14</sup> H. LOHRISCH: Zeitschr. physiol. Chem. 1906, 47, 20.

<sup>15</sup> A. KÜRSCHNER u. A. HOFFER: Chem.-Ztg. 1931, 55, 162.

<sup>16</sup> Vgl. S. 928.

<sup>17</sup> J. KÖNIG: Z. 1898, 1, 1.

säure); zwar ist diese Rohfaser kohlenstoffreicher (ligninreicher) als die Rohfaser nach dem „Weender Verfahren“; indes läßt sich dieser kohlenstoffreichere Anteil nach weiteren Untersuchungen von J. KÖNIG<sup>1</sup> leicht durch Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak entfernen und so indirekt bestimmen.

In einigen Fällen nähert sich die Elementarzusammensetzung des Oxydationsrückstandes der wahren Cellulose; in vielen Fällen aber ist der Kohlenstoff erheblich höher als bei dieser (44,44%) und diese letzten Reste kohlenstoffreicher Stoffe in der Cellulose lassen sich auch durch sehr anhaltende Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd und Ammoniak nicht entfernen. Behandelt man aber den Oxydationsrückstand mit Kupferoxydammoniak, so löst sich die Cellulose leicht und zurück bleibt ein kohlenstoffreicher Rest, der, weil er mit dem „cutine“ FREMYS große Ähnlichkeit hat, von KÖNIG Cutin genannt wird.

Der in Kupferoxydammoniak gelöste, durch Salzsäure oder Alkohol ausgefällte Anteil hat dann in der Regel die Elementarzusammensetzung der wahren Cellulose; in einigen Fällen behält sie aber auch noch einen etwas höheren Kohlenstoffgehalt. Dieser rührt alsdann von substituierten Methyl- oder Methoxylgruppen ( $-O \cdot CH_3$ ) her.

Das Verfahren von J. KÖNIG wird hinsichtlich der Entfernung der Pentosane aus der Rohfaser auch nicht von dem Verfahren von TOLLENS-DMOCHOWSKI<sup>2</sup> erreicht, das darin besteht, daß die zunächst nach dem Weender Verfahren erhaltene Rohfaser einer Nachbehandlung mit Salpetersäure unterworfen wird. Dieses Verfahren führt nach F. HÜHN<sup>3</sup> zwar zu einer sehr vollständigen Beseitigung der Lignine, nicht aber der Hemi- und -pentosane; noch weniger ist dies nach dem Verfahren von CROSS und BEVAN<sup>4</sup> der Fall, bei dem ausschließlich mit Chlor oxydiert wird. Dieses Verfahren prüften H. MATTHES und F. KÖNIG<sup>5</sup> an Chinarinde und Filtrierpapier nach; sie erhielten dabei erheblich höhere Ausbeuten als nach J. KÖNIG, was aber unter Umständen auf einen größeren Gehalt dieser Stoffe an Hemi- oder Oxycellulose bzw. Pentosanen zurückführbar ist. Ein weiterer Vorschlag von TH. v. FELLEBERG<sup>6</sup> gründet sich auf die Beobachtung, daß die Lignine durch kurzes Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure zu Körpern oxydiert werden, die in Alkalien leicht löslich sind. Nach dem Verfahren erhielt jedoch J. RUFFY<sup>7</sup> bei Kakao und Schokolade weniger günstige Werte als nach den KÖNIGschen Verfahren. Sehr einfach ausführbar ist die neue Vorschrift von K. KÜRSCHNER und A. HANAK<sup>8</sup>, die zu einem rein weißen Produkt von hoher Ausbeute — bei Baumwolle wurden von 95% Cellulose 92,0—92,5% wiedergefunden — führt, wenn auch wahrscheinlich die Hemicellulosen hierbei weniger vollständig als nach J. KÖNIG entfernt werden. Neuerdings hat v. FELLEBERG<sup>9</sup> das Verfahren von KÜRSCHNER und HANAK zu einem Mikroverfahren umgearbeitet.

Von den genannten Verfahren entspricht das von HENNEBERG und STOHMANN (das sog. Weender Verfahren<sup>10</sup>) am engsten dem oben (S. 936) aufgestellten Rohfaserbegriff. Das Verfahren von KÖNIG liefert die am meisten von Pentosanen und Hemicellulosen befreite Rohfaser, während das von KÜRSCHNER und HANAK auf einfachste Weise zu einem ligninfreien Produkt

<sup>1</sup> J. KÖNIG: Z. 1903, 6, 769.

<sup>2</sup> TOLLENS-DMOCHOWSKI: Journ. f. Landw. 1910. — Nach F. HÜHN, Anm. 3. — Über eine Vereinfachung des Verfahrens vgl. VENKATE RAO u. B. TOLLENS: Journ. Landw. 1913, 61, 237; Z. 1915, 30, 434.

<sup>3</sup> F. HÜHN: Die Bestimmung der Cellulose in Holzarten und Gespinnstfasern. Dissertation Münster i. W. 1911.

<sup>4</sup> CROSS u. BEVAN: Cellulose, 95. Nach F. HÜHN, Anm. 3.

<sup>5</sup> H. MATTHES u. F. KÖNIG: Arch. Pharm. 1914, 251, 233; Z. 1915, 30, 105. Dort findet sich auch eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens von CROSS und BEVAN, in der Abänderung von MATTHES und KÖNIG.

<sup>6</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1919, 9, 277; C. 1919, II, 685.

<sup>7</sup> J. RUFFY: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene, 1929, 20, 355; C. 1930, I, 1239.

<sup>8</sup> K. KÜRSCHNER u. A. HANAK: Z. 1930, 59, 484.

<sup>9</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene, 1930, 21, 385.

<sup>10</sup> Nach der Versuchsstation Weende bei Göttingen benannt, wo HENNEBERG und STOHMANN ihr Verfahren ausarbeiteten.

führt. Diese drei Verfahren sollen daher unter Berücksichtigung einiger Verbesserungsvorschläge und einiger zweckmäßiger Abänderungen auf Grund eigener Erfahrungen bei den beiden erstgenannten Verfahren näher beschrieben werden.

## 1. Bestimmung der Rohfaser nach W. HENNEBERG und H. STOHMANN.

Die Ausführung des Verfahrens stößt bei vielen Stoffen auf praktische Schwierigkeiten, bestehend in starkem Stoßen der zu kochenden Mischung, übermäßigem Schäumen, besonders der alkalischen Kochung und in Filtrationsschwierigkeiten. Zur Vermeidung dieser arbeitet man zweckmäßig, wie folgt:

3 g des lufttrockenen, feingepulverten Stoffes werden mit 200 ccm einer 1,25%igen Schwefelsäure<sup>1</sup> 30 Minuten in einem ERLÉNMEYER-Kolben aus Jenaer Glas von 500 ccm Inhalt<sup>2</sup> auf einer dicken Asbestplatte am Rückflußkühler<sup>3</sup> im leichten Sieden gehalten. Dann läßt man kurz absitzen und filtriert so heiß wie möglich<sup>4</sup> durch ein möglichst breites Filter<sup>5</sup> aus möglichst wenig fein zerfasertem Asbest<sup>6</sup>. Bei feinpulverigen Stoffen empfiehlt es sich, hierbei anfangs nur schwach anzusaugen<sup>7</sup>, dann ohne Druck so heiß wie möglich<sup>8</sup> zu filtrieren, mit heißem Wasser nachzuwaschen und dann wieder scharf abzugsaugen. — Den so erhaltenen Rückstand spritzt man mittels 1,25%iger Kalilauge<sup>9</sup> mitsamt Asbest in den ERLÉNMEYER-Kolben zurück, füllt mit der gleichen Lauge wieder auf 200 ccm<sup>10</sup> an, setzt 1–2 ccm Amylalkohol hinzu<sup>11</sup> und kocht ebenfalls wieder 30 Minuten unter leichtem Sieden, filtriert durch ein neues Asbestfilter, wäscht mit heißem Wasser, dann mit Alkohol und Äther<sup>12</sup> aus, führt schließlich die Rohfaser nebst Asbestfilter in eine Platin- oder Quarzschale über<sup>13</sup> und trocknet bei 105–110° bis zur Gewichtsbeständigkeit. Als-

<sup>1</sup> Man löst 25 g konz. Schwefelsäure in Wasser und füllt auf 2 Liter auf.

<sup>2</sup> Man kann den Stand der Flüssigkeit mit einem Farbstift kennzeichnen und bei der 2. Kochung mit Kalilauge auf dieselbe Raummenge auffüllen.

<sup>3</sup> Zur Konstanthaltung des Volumens der Kochflüssigkeit. — Ersatzweise kann auch ein Steigrohr verwendet werden.

<sup>4</sup> Beim Abkühlen auftretende Ausscheidungen sind meistens die Ursache von Filterverstopfungen; außerdem ist die Filtrationszeit in der Hitze mehrfach kürzer als in der Kälte.

<sup>5</sup> Trichter mit Siebplatte. — Vielleicht sind Glasfiltrertiegel, gegebenenfalls mit Asbestbedeckung, hier besonders geeignet.

<sup>6</sup> Größere Asbeststückchen würden bei der folgenden Kochung Stoßen bewirken.

<sup>7</sup> Damit das Filter beim Aufgießen nicht zerstört wird. — Bei nicht mehlartigen Stoffen läßt sich der Rückstand auch meistens ganz absaugen, wenn man die Mischung siedend heiß auf das Filter gießt. — Wenn infolge unvorsichtigen oder zu frühen Ansaugens mit der Saugpumpe das Filter mit der darauf befindlichen Rohfaser undurchlässig geworden sein sollte, empfiehlt es sich, den Tiegel in einen Ring zu hängen und einfach bis zum folgenden Tage oder länger sich selbst zu überlassen; meistens beginnt dabei die Filtration nach Entfernung des Saugdruckes von selbst wieder. Sollte dies auch bis zum folgenden Tage nicht der Fall sein, so spült man die Rohfaser nebst Asbest in das Becherglas zurück und filtriert durch ein neu hergestelltes Asbestfilter.

<sup>8</sup> Gegebenenfalls durch Einstellen des Tiegels in einen passenden Ring aus Porzellan oder Metall in einem Heizschrank. Vgl. S. 942.

<sup>9</sup> 25 g Kaliumhydroxyd in Wasser gelöst und auf 2 Liter aufgefüllt.

<sup>10</sup> Bis zur Marke oder unter Messung der zugefügten Menge.

<sup>11</sup> Der Amylalkohol verhindert infolge Herabsetzung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit das Schäumen. Vgl. J. GROSSFELD: Anleitung zur Untersuchung der Lebensmittel, S. 67.

<sup>12</sup> F. MACH u. P. LEDERLE (Chem.-Ztg. 1919, 43, 251; C. 1919, IV, 296) empfehlen für diesen Zweck statt Alkohol-Äther Aceton.

<sup>13</sup> Kleinere Mengen Rohfaser lassen sich auch leicht im GOOCH-Tiegel trocknen und veraschen. — Es empfiehlt sich aber hier zur Vermeidung von Filtrationsschwierigkeiten GOOCH-Tiegel mit nicht zu engen Sieblöchern zu verwenden.

dann wird in üblicher Weise verascht und der zurückbleibende Glührückstand vom Gewichte vor der Veraschung abgezogen. Der Unterschied ergibt die Menge aschefreie Rohfaser in 3 g.

Handelt es sich um genügend gleichmäßige pulverförmige Stoffe, wie z. B. Kakao<sup>1</sup>, so empfiehlt es sich oft, nur einen Teil der obigen Einwaage, also z. B. 1,0 oder 0,5 g bei entsprechender Verminderung der Reagensmengen zu verarbeiten. Bei Mehl mit wenig Rohfaser kann man auch größere Mengen, etwa 5 g mit obigen Reagenzien verarbeiten. Die Genauigkeit der Rohfaserbestimmung ist in erster Linie von der sorgfältigen Trocknung und genauen, raschen<sup>2</sup> Wägung der Rohfaser selbst abhängig. Die Konzentration der verwendeten Lösungen und die Zeitdauer der Kochung folgen dabei erst in zweiter Linie.

Von einigen weiteren Abänderungsvorschlägen für das WEENDER-Verfahren seien folgende genannt: W. A. WITHERS empfiehlt erst mit Kalilauge, dann mit Schwefelsäure zu kochen, was besonders bei proteinreichen Stoffen Vorteile bietet. E. B. FORBES und J. B. MENSCHING<sup>3</sup> neutralisieren nach der ersten Kochung mit Natronlauge ohne zu filtrieren und führen dann nach Zusatz weiterer Natronlauge die alkalische Kochung aus. Das Verfahren liefert jedoch so etwas höhere Werte als das Weender Verfahren. Ähnlich verfährt auch H. KALNING<sup>4</sup>. U. H. PURANEN und E. S. TOMULA<sup>5</sup> geben an, daß dieser Plus-Fehler durch das Ausfallen von Phytin durch die Lauge bedingt ist, und durch Auswaschen der Rohfaser mit verdünnter Säure wieder aufgehoben werden kann. PURANEN und TOMULA lassen nach der ersten Kochung mit 1,25%iger Schwefelsäure etwas abkühlen, setzen dann 20 cem 28%ige Kalilauge zu, führen die zweite Kochung aus, filtrieren durch Asbest, waschen 5mal mit heißem Wasser und darauf mit warmer 1,25%iger Schwefelsäure aus. Schließlich folgt die letzte gründliche Auswaschung der Rohfaser mit heißem Wasser, Alkohol und Äther oder auch Aceton. Eine Abänderung von H. STIEGLER<sup>6</sup>, die bei leichter Ausführbarkeit angeblich gleiche Ergebnisse wie das Weender Verfahren liefert, besteht hauptsächlich darin, daß die Kochung mit Säure (Salzsäure) wie die mit Lauge in einem geschlossenen SOXHLET-Fläschchen im siedenden Wasserbade erfolgt; auf die näheren Einzelheiten sei hier verwiesen. Für die Filtration haben F. HOLDEFLEISS<sup>7</sup> und W. WATTENBERG<sup>8</sup> besondere Vorrichtungen ersonnen. H. HOLLDAK<sup>9</sup> saugt die gekochte Flüssigkeit mittels eines mit Leinwand überspannten umgekehrten Trichters ab. Ähnlich verfährt J. SCHRÖDER<sup>10</sup> unter Ersatz der Leinwand durch eine 3—4fache Lage Seidenflor, während R. FANTO und W. NIKOLITSCH<sup>11</sup> zur Filtration der Rohfaser Filterhülsen, wie sie im SOXHLET-Apparat verwendet werden, empfehlen. Zur Verhinderung des Stoßens bedeckt W. LEPPER<sup>12</sup> den Boden des Kochgefäßes mit Glasperlen, die sich beim Filtrieren leicht zurückhalten lassen. Noch einfacher ist nach LEPPER<sup>13</sup> Verwendung einer durchlöcherten für diesen Zweck besonders hergestellte Porzellanplatte<sup>14</sup>.

## 2. Bestimmung der Rohfaser nach J. KÖNIG<sup>15</sup>.

Das Verfahren hat gegenüber dem von HENNEBERG und STOHMANN auch den praktischen Vorteil einer nur einmaligen Filtration. Zur Ausführung ist folgende Arbeitsvorschrift zu empfehlen:

- <sup>1</sup> Vgl. J. GROSSFELD: Z. 1926, 51, 260.
- <sup>2</sup> Weil die Rohfaser außerordentlich hygroskopisch ist. — Für diese Wägungen sind daher besondere Waagen mit Schwingungsdämpfung zu empfehlen.
- <sup>3</sup> E. B. FORBES and J. E. MENSCHING: Ind. Engin. chem. 1933, 5, 258; Z. 1914, 27, 236.
- <sup>4</sup> H. KALNING: Zeitschr. ges. Getreidewesen 1913, 5, 6; Z. 1914, 28, 162.
- <sup>5</sup> U. H. PURANEN u. E. S. TOMULA: Suomen Kemistilehti 1930, 3, 85; C. 1931, I, 706.
- <sup>6</sup> H. STIEGLER: Journ. Landw. 1913, 61, 399; Z. 1915, 30, 433.
- <sup>7</sup> F. HOLDEFLEISS: Landw. Jahrb. 1877, Suppl.-Bd., S. 103.
- <sup>8</sup> W. WATTENBERG: Journ. Landw. 1880, 21, 237.
- <sup>9</sup> H. HOLLDAK: Chem.-Ztg. 1903, 27, 34.
- <sup>10</sup> J. SCHRÖDER: Journ. Landw. 1911, 59, 105; Z. 1913, 26, 454.
- <sup>11</sup> R. FANTO u. W. NIKOLITSCH: Zeitschr. analyt. Chem. 1915, 54, 73; Z. 1915, 30, 433.
- <sup>12</sup> W. LEPPER: Chem.-Ztg. 1926, 50, 211; Z. 1927, 53, 283.
- <sup>13</sup> W. LEPPER: Landw. Vers.-Stationen 1933, 117, 125.
- <sup>14</sup> Zu beziehen von der Firma Gerhardt in Bonn.
- <sup>15</sup> J. KÖNIG: Z. 1898, 1, 1; 1903, 6, 769.

3 g<sup>1</sup> lufttrockene<sup>2</sup> Substanz mit 5–14% Wasser werden, bei Fettgehalten über 10% nach vorhergehender Entfettung, in einem 500–600 ccm-Kolben oder in einer 500–600 ccm fassenden Porzellanschale<sup>3</sup> mit 200 ccm Glycerin vom spezifischen Gewichte 1,23, welches 20 g konz. Schwefelsäure im Liter enthält, versetzt, durch häufiges Schütteln bzw. Rühren mit einem Glasstabe gut verteilt und entweder am Rückflußkühler bei 133–135° 1 Stunde gekocht oder in einem Autoklaven bei 137° (= 3 Atmosphären<sup>4</sup>) 1 Stunde lang gedämpft. Darauf läßt man erkalten, verdünnt den Inhalt des Kolbens oder der Schale auf ungefähr 400 bis 500 ccm<sup>5</sup>, kocht nochmals auf und filtriert.

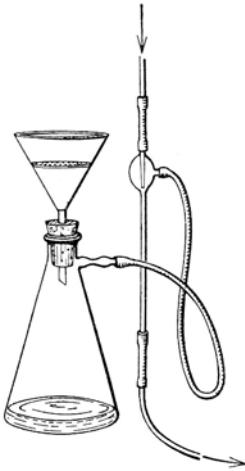


Abb. 13. Vorrichtung für die Filtration der Rohfaser.

Die Filtration erfolgt bei nicht zu feinpulverigen Stoffen am besten durch Absaugen der möglichst heißen Flüssigkeit durch eine mit Asbest bedeckte Siebplatte auf einem Saugtrichter (Abb. 13). Für feinpulverige Stoffe, die eine schwer filtrierbare Rohfaser liefern, empfiehlt sich folgende Arbeitsweise<sup>6</sup>: Man beschickt Tiegel mit Siebboden aus Reinnickel, wie sie KÖNIG empfohlen hat, von möglichst großer Filterfläche oder auch die neuerdings in den Handel kommenden Glas-

filtriertiegel von der Porenweite 1 mit einem nicht zu dünnen Asbestfilter, das neben der Filtration auch die Aufgabe hat, ein leichtes quantitatives Herausbringen der Rohfaser nach der Filtration und ein sicheres Überführen in eine Platinschale zu ermöglichen. Diesen Tiegel steckt man sodann in die Öffnung eines passenden Ringes aus Porzellan oder Metall, den man auf ein Becherglas legt. Nunmehr gießt man die über der Rohfaser stehende Flüssigkeit so heiß wie möglich auf das Filter, worauf sofort eine stetige Filtration beginnt, bei der man nur durch Nachfüllen dafür sorgt, daß der Tiegel nicht völlig leer läuft. Vorteilhaft ist es, das Filtrat vorsichtig so weit zu erhitzen, daß die heißen Dämpfe den Tiegel umspülen und ein vorzeitiges Erkalten des Inhaltes, wodurch die Filtration verlangsamt würde, verhindern. Auf diese Weise gelingt es ohne Anwendung der Saugpumpe<sup>7</sup> auch eine feine Rohfaser sicher abzufiltrieren. Schließlich wäscht man den Rückstand mit siedend heißem Wasser aus, bis das Wasser völlig klar abläuft, und saugt an der Saugpumpe scharf ab. Alsdann übergießt man den

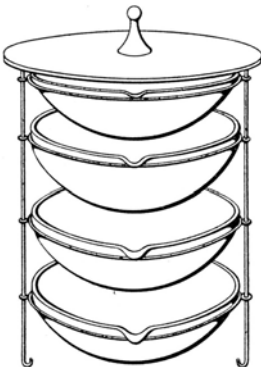


Abb. 14. Autoklaveinsatz für Rohfaserbestimmung nach KÖNIG.

<sup>1</sup> Bei rohfaseranremen Mehlen auch mehr.

<sup>2</sup> Dickflüssige bzw. breiartige Massen, wie z. B. Schlempe, Marmelade usw. kann man in Mengen, die etwa 3 g Trockensubstanz entsprechen, vorher in den zu verwendenden Kolben oder Schalen auf dem Wasserbade eintrocknen, darauf mit der Glycerin-Schwefelsäure wieder aufweichen und weiter behandeln.

<sup>3</sup> Für die Behandlung im Autoklaven.

<sup>4</sup> Autoklaven mit automatischer Druckeinstellung stellt Franz Hegershoff in Leipzig her.

<sup>5</sup> W. GREIFENHAGEN (Z. 1912, 23, 101) filtrierte die unverdünnte, heiße Flüssigkeit durch eine mit Asbest beschickte Nutsche von 10,5 cm Durchmesser und konnte so Filtration und Auswaschung auch bei Kakao in Baumwollsaamen in wenigen Minuten durchführen.

<sup>6</sup> Vgl. J. GROSSFELD: Z. 1914, 27, 333.

<sup>7</sup> Wenn das Filter infolge zu frühen oder unvorsichtigen Ansaugens dennoch undurchlässig geworden sein sollte, verfährt man nach Anm. 7, S. 940.

Rückstand mit heißem 80–90%igen Alkohol, wobei sich erneut organische Stoffe unter Dunkelfärbung des Filtrates lösen, wäscht mit heißem Spiritus aus, bis das Filtrat wieder farblos abläuft, und saugt abermals scharf ab. Am Schlusse wäscht man mit Äther allein aus. Hierauf führt man das Asbestfilter und die darauf befindliche Rohfaser quantitativ in eine Platinschale über, trocknet bei 105–110° bis zur Gewichtsbeständigkeit<sup>1</sup>. Alsdann wird in üblicher Weise verascht und der zurückbleibende Glührückstand vom Gewichte der Schale vor dem Veraschen abgezogen. Der Unterschied gibt die Menge aschenfreie Rohfaser in 3 g, mithin durch Malnehmung mit 33,3 in Prozent an.

Für die Reihenbestimmungen verwendet KÖNIG eine Vorrichtung, bestehend aus einem Gestell mit mehreren nebeneinander befindlichen Heizbrennern und Rückflußkühlern oder für die Dämpfung im Autoklaven einen Einsatz von nebenstehend abgebildeter Form (Abb. 14). H. SCHMIDT-HEBBEL<sup>2</sup> empfiehlt die Aufschließung im Autoklaven in kochbeständigen Gläsern (Weckgläsern) vorzunehmen.

### 3. Bestimmung der Rohfaser nach K. KÜRSCHNER und A. HANAK<sup>3</sup>.

a) Nach einem von TH. v. FELLEBERG<sup>4</sup> angegebenen Verfahren werden die Cellulosebegleitstoffe durch Aufschluß mit N.-Salpetersäure löslich gemacht und anschließend mit Wasser, 1%iger Natronlauge, heißer Salpetersäure, Ammoniak, Alkohol und Äther entfernt. Nach KÜRSCHNER und HANAK wird dieses Ziel jedoch nicht vollständig erreicht; dafür gelang es ihnen, eine von Ligninen völlig freie Cellulose von fast weißer Farbe dadurch zu erhalten, daß sie mit 7%iger Salpetersäure in 80%iger Essigsäure aufschlossen. Das Verfahren, bei dem die Lignine anscheinend nitriert und dadurch löslich werden, gestaltet sich z. B. für Kakao, wie folgt:

0,3 g des nicht entfetteten Kakaos werden in einem Aufschlußgefäß aus Jenaer Glas von nebenstehender Form (Abb. 15)<sup>5</sup> und 30–35 ccm Inhalt mit Steigrohr in 15 ccm 80%iger Essigsäure und 1,5 ccm Salpetersäure (D. 1,4) durch Umschwenken gleichmäßig verteilt. Nun wird das Kölbchen mit dem eingeschlifenen Kühlrohr versehen und das Gemisch 20–25 Minuten mit ganz kleiner Flamme in kräftigem Sieden gehalten. Hierauf wird heiß durch einen großporigen Porzellan- oder Glasfiltertiegel, den man vor dem Filtrieren mit ein wenig Essigsäure angefeuchtet hat, abgesogen. Alsdann wird nacheinander mit 7–10 ccm Reagenslösung (1 Vol. Salpetersäure + 10 Vol. 80%ige Essigsäure), heißem Wasser, einigen Tropfen Alkohol zur Durchfeuchtung, 5–10 ccm Äther, nochmals 1–2 ccm heißem Aufschlußreagens und schließlich mit heißem Wasser bis zum völligen Verschwinden des Essigsäureruches ausgewaschen. Sämtliche Waschflüssigkeiten werden vorher in



Abb. 15.  
Aufschlußgerät nach  
KÜRSCHNER und HANAK.

<sup>1</sup> Da die Rohfaser äußerst hygroskopisch ist, empfiehlt sich ein rasches Wägen unmittelbar, nachdem die Schale im Exsiccator erkaltet ist. — Vgl. Anm. 2, S. 941.

<sup>2</sup> H. SCHMIDT-HEBBEL: Pharm. Zentralh. 1933, 74, 609.

<sup>3</sup> K. KÜRSCHNER u. A. HANAK: Z. 1930, 59, 484.

<sup>4</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1918, 9, 277.

<sup>5</sup> Der Versuch kann im Notfalle auch in einem schmalen und hohen Bechergläschen oder in einem größeren Probierröhrchen durchgeführt werden.



kleinen Anteilen von 1–2 ccm zwecks Herausspülung der letzten Reste der Rohcellulose in das Aufschlußkölbchen gebracht und darin erhitzt. Zu achten ist darauf, daß beim Waschen mit Äther die Tiegelwände sorgfältig gespült werden. Zwecks rascher Trocknung kann man am Schluß noch mit Alkohol und Äther nachwaschen. Das Trocknen der Rohcellulose<sup>1</sup> erfolgt durch allmähliches Erhitzen auf 105–108°.

G. STEINHOFF<sup>2</sup> empfiehlt das Verfahren besonders auch für die Untersuchung von Kartoffeln und Erzeugnissen daraus. Er findet so fast die gleichen Ergebnisse wie nach den Verfahren von HENNEBERG und STOHMANN und KÖNIG.

b) Das vorstehende Verfahren von KÜRSCHNER und HANAK hat TH. v. FELLEBERG<sup>3</sup> in eine Mikroausführungsform umgewandelt, nach der noch 0,5 mg Rohfaser genau bestimmbar sind, indem er statt der Wägung am Schluß sein Oxydationsverfahren mit Chromsäure-Schwefelsäure anwendet:

Mikrochemische Rohfaserbestimmung. Man benetzt soviel Pulver, als 0,5–5 mg Rohfaser entspricht (Feinmehl 0,5, Schokolade 0,2, Kakao 0,1 g) in einem geräumigen Reagensglas zunächst mit wenigen Tropfen des Reagens nach KÜRSCHNER und HANAK, fügt dann weiter im ganzen 10 ccm davon, sowie einige Bimssteinkörnchen zu, setzt Birnenkühler nach v. FELLEBERG auf und hält 20 Minuten in leichtem Sieden. Dann folgt die Filtration durch Asbest auf kleiner Siebplatte aus Porzellan oder Platin, Auswaschen mit einigen Kubikzentimetern heißem Reagens, dann mit heißem Wasser, darauf mit Alkohol und mehrmals zur Entfernung des Fettes mit Äther, wieder mit heißem Reagens und Wasser, bis der Geruch nach Essigsäure beseitigt ist. Das Filter wird dann wie bei der Stärkebestimmung in Kindernährmehl (S. 917) verbrannt. 1 ccm 0,1 N. Kaliumbichromatlösung entspricht 0,675 mg Cellulose.

Eine allgemein anwendbare Form des Verfahrens wird durch folgende Vorschrift von K. SCHARREER und K. KÜRSCHNER<sup>4</sup> gegeben: 3 g der Substanz (bei homogenem Material 1 g) werden mit 75 ccm 70%iger Essigsäure, 5 ccm konzentrierter Salpetersäure und 2 g Trichloressigsäure (in fester Form zuzugeben) ½ Stunde unter Rückflußkühlung gekocht. Bei 1 g Einwaage wird die Menge der Reagenzien auf ⅓ verringert. Der Rückstand wird abfiltriert, mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gründlich ausgewaschen, bei 100–110° getrocknet, gewogen, verascht und die Asche abgezogen.

Die so erhaltenen Ergebnisse sind durchweg etwas niedriger als nach dem WEENDER und dem KÖNIGSchen Verfahren. So wurden gefunden:

| Gegenstand         | Rohfaser nach dem Verfahren von |       |                        |
|--------------------|---------------------------------|-------|------------------------|
|                    | WEENDER                         | KÖNIG | SCHARREER u. KÜRSCHNER |
| Reis . . . . .     | 0,60                            | 0,90  | 0,60                   |
| Sojaschrot . . . . | 5,21                            | 6,79  | 6,48                   |
| Gerstenschrot . .  | 4,84                            | 6,65  | 4,74                   |
| Roggenbrot . . . . | 3,97                            | 4,88  | 2,66                   |
| Haferschrot . . .  | 9,55                            | 9,88  | 8,99                   |
| Roggenstroh . . .  | 46,56                           | 49,56 | 41,19                  |
| Buchenmehl . . .   | 31,21                           | 29,50 | 22,00                  |
| Erdnußkuchenmehl   | 4,58                            | 4,29  | 4,68                   |

v. FELLEBERG empfiehlt das Reagens von KÜRSCHNER und HANAK auch zur Freilegung der Rohfaser für mikroskopische Untersuchungen.

Auch mit einem Gemisch von Alkohol und Salpetersäure (20 ccm 96%iger Alkohol, 5 ccm konz. Salpetersäure auf 1 g Holz) erhielten K. KÜRSCHNER und A. HOFFER<sup>5</sup> bei Holzarten eine ligninfreie Cellulose mit konstantem Pentosangehalt, allerdings erst, wenn sie mit der Reagensmischung zunächst eine Stunde

kochten, dann das Reagens erneuerten und abermals — nötigenfalls nochmals, wenn Phloroglucin-Salzsäure in der Kälte noch Rotfärbung lieferte — eine Stunde kochten. Die

<sup>1</sup> KÜRSCHNER u. HANAK fanden in solcher Rohfaser aus 0,4 g Kakao 1,3 mg Asche.

<sup>2</sup> G. STEINHOFF: Zeitschr. Spiritusind. 1933, 56, 61.

<sup>3</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 385.

<sup>4</sup> K. SCHARREER u. K. KÜRSCHNER: Biedermanns Zentralbl. B. Tierernährung 1931, 3, 302.

<sup>5</sup> K. KÜRSCHNER u. A. HOFFER: Chem.-Ztg. 1931, 55, 161 u. 182.

Pentosanverhältniszahl:  $PVZ. = 100 \frac{P}{p \cdot R}$ , worin  $P$  den Pentosengehalt des Holzes,  $p$  den der Rohfaser (Cellulose),  $R$  die Rohfaser selbst bedeuten, betrug bei Holzarten angenähert 4 (3,22—4,44).

## B. Bestimmung von Cellulose, Lignin und Cutin.

### 1. Bestimmung von Cellulose, Lignin und Cutin nebeneinander nach J. KÖNIG.

Eine zweite Probe von 3 g lufttrockener bzw. 5—14% Wasser enthaltender Substanz wird abgewogen und genau in derselben Weise behandelt, wie bei der Rohfaserbestimmung S. 941 angegeben ist. Der Rückstand in dem GOOCH-Tiegel oder auf der Porzellanplatte wird dann aber nicht getrocknet, sondern nach dem Absaugen des zuletzt zum Auswaschen verwendeten Äthers und nach dessen Verdunstung an der Luft nebst dem Asbestfilter verlustlos in ein etwa 800 ccm fassendes Becherglas gebracht und unter Bedecken mit einem Uhrglase mit 100 oder 150 ccm chemisch reinem, 3-gewichtsprozentigen Wasserstoffsperoxyd sowie 10 ccm 24%igem Ammoniak versetzt und einige Zeit (etwa 12 Stunden) stehen gelassen; dann werden 10 ccm 30-gewichtsprozentiges, chemisch reines Wasserstoffsperoxyd zugesetzt und dieses, wenn die Sauerstoffentwicklung aufgehört hat, noch 2—6mal, d. h. so oft wiederholt, bis die Masse (Rohfaser) völlig weiß geworden ist. Beim dritten und fünften Zusatz von Wasserstoffsperoxyd fügt man auch noch je 5 ccm (oder 10 ccm) des 24%igen Ammoniaks hinzu. Man kann Wasserstoffsperoxyd und Ammoniak in graduierten Zylindern mit eingeschliffenen Glasstöpseln vorrätig halten und aus diesen die jedesmaligen Mengen der Flüssigkeit zusetzen; ein ganz genaues Abmessen der Flüssigkeiten bei dem jedesmaligen Zusatze ist nicht notwendig. Wenn die Substanz völlig weiß geworden ist, erwärmt man etwa 1—2 Stunden im Wasserbade und kann dann, wenn das Wasserstoffsperoxyd rein war, d. h. mit Ammoniak keinerlei Niederschlag oder Trübung gab, sofort und glatt durch ein zweites Asbestfilter filtrieren<sup>1</sup>.

Der abfiltrierte und ausgewaschene Rückstand wird samt Asbestfilter 2 Stunden mit 75 ccm Kupferoxydammoniak<sup>2</sup> unter öfterem Umrühren, zuletzt kurze Zeit bei ganz geringer Wärme auf dem Wasserbade behandelt und die Flüssigkeit durch einen GOOCH-Tiegel mit schwacher Asbestlage<sup>3</sup> filtriert. Die letzten Reste der ammoniakalischen Lösung werden unter Zufügung von etwas frischem Kupferoxydammoniak behufs Auswaschens abgesogen, das Filtrat beiseite gestellt, der Rückstand im Tiegel dagegen unter Anwendung einer neuen Saugflasche genügend mit Wasser nachgewaschen, darauf bei 105 bis 110° getrocknet, gewogen, gegluht und wieder gewogen. Der Glühverlust ergibt die Menge des nicht oxydierbaren, in Kupferoxydammoniak unlöslichen Teiles der Rohfaser, das Cutin.

<sup>1</sup> Will man nur die Lignine in der Rohfaser bestimmen, so kann man den weißoxydierten Rückstand wie bei der Rohfaserbestimmung trocknen, wägen, glühen und wieder wägen. Der Glühverlust stellt dann die Rohcellulose dar und diese, von der Rohfaser abgezogen, liefert die Menge Lignine.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Für die Darstellung des Kupferoxydammoniaks kann man das käufliche reine Kupferoxydhydrat (MERCK) verwenden. Man löst es in 20—24%igem Ammoniak bis zur Sättigung, was durch Eintragen eines Überschusses in das Ammoniak und durch öfteres Umschütteln erreicht wird, läßt absitzen und verwendet die überstehende Lösung direkt zur Lösung der Cellulose.

<sup>3</sup> Wenn von der ersten Rohfaser-Filtration ziemlich viel Asbest in der Flüssigkeit ist, kann man auch ohne eine zweite Asbestlage ein genügend dichtes Filter dadurch erhalten, daß man die Flüssigkeit umrührt und das erste Filtrat so oft zurückgibt, bis es völlig klar geworden ist.

Das Filtrat von diesem Rückstande, d. h. die Lösung der Cellulose in Kupferoxydammoniak wird mit 300 ccm 80%igem Alkohol versetzt und stark gerührt; hierdurch scheidet sich die Cellulose in großen Flocken quantitativ wieder aus. Sie wird in üblicher Weise im GOOCH-Tiegel<sup>1</sup> gesammelt, zuerst mit warmer verdünnter Salzsäure<sup>2</sup>, dann genügend mit Wasser, zuletzt mit Alkohol und Äther ausgewaschen, bei 105–110° getrocknet, gewogen und verascht. Der Gewichtsunterschied zwischen dem Gewicht des Tiegelinhaltes vor und nach dem Glühen ergibt die Menge Reincellulose.

Der Unterschied von Gesamt-Rohfaser minus (Cellulose + Cutin) ergibt die Menge des oxydierbaren Anteiles der Rohfaser, die sog. Lignine, die aber genauer nach folgendem Abschnitt gefunden werden<sup>3</sup>.

## 2. Direkte Bestimmung der Lignine durch Hydrolyse der Cellulose.

Die Cellulose kann von dem unlöslich bleibenden Lignin in der Zellmembran oder Rohfaser quantitativ getrennt werden:

a) Durch Behandeln mit 72%iger Schwefelsäure nach H. OST und L. WILKENING<sup>4</sup>, bis mikroskopisch mit Jod keine Cellulose mehr nachweisbar ist.

b) Durch Behandeln mit Salzsäure vom Spezifischen Gewicht 1,21 nach R. WILLSTÄTTER und L. ZECHMEISTER<sup>5</sup>.

c) Durch 6–7stündiges Dämpfen mit 1%iger Salzsäure unter einem Druck von 5 bis 6 Atmosphären nach J. KÖNIG und E. RUMP<sup>6</sup>.

d) Durch Behandeln mit Chlorwasserstoffgas nach J. KÖNIG und E. BECKER<sup>7</sup>, anschließend an das Verfahren von H. KRULL<sup>8</sup>.

Alle 4 Verfahren liefern im wesentlichen gleiche Ergebnisse, so nach KÖNIG und BECKER im Mittel mehrerer Holzarten für die Trockenmasse an Lignin:

Tabelle 22.

| Holzart       | Zahl der Proben | Behandlung mit          |                     |                              |                       |
|---------------|-----------------|-------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|
|               |                 | 72%iger Schwefelsäure % | Salzsäure D. 1,21 % | 1%iger Salzsäure (Dämpfen) % | Chlorwasserstoffgas % |
| Nadelholz . . | 3               | 27,53                   | 28,77               | 29,43                        | 28,82                 |
| Laubholz . .  | 8               | 22,86                   | 24,45               | 24,22                        | 23,77                 |

Am einfachsten erscheint das Verfahren von OST und WILKENING; es hat aber nach J. KÖNIG<sup>9</sup> den Nachteil, daß die Schwefelsäure mit einigen Ligninen

<sup>1</sup> Die GOOCH-Porzellantiegel werden heute in guter Haltbarkeit angefertigt, so daß sie das Glühen recht wohl aushalten.

<sup>2</sup> Die letzten Reste Kupferoxyd lassen sich nur schwer aus der Cellulose entfernen. Das hat aber auf die quantitative Bestimmung keinen wesentlichen Einfluß, weil sie mit der im Glührückstande verbleibenden Asche in Abzug gebracht werden.

<sup>3</sup> Der Rest von Gesamt-Rohfaser minus (Cellulose + Cutin) schließt auch die in der Rohfaser vorhandene Stickstoffsubstanz sowie den Rest der Hemicellulosen mit ein, die durch das Aufschließen mit Glycerin-Schwefelsäure nicht gelöst worden sind. Denn die Hemicellulosen werden durch das angewendete Wasserstoffsperoxyd und Ammoniak ebenfalls stark oxydiert, während die wahre Cellulose (wie reinste Baumwolle, schwedisches Filtrierpapier) davon nicht angegriffen wird. Andererseits werden durch die Behandlung mit Glycerin-Schwefelsäure ligninartige, d. h. mehr als 46% Kohlenstoff enthaltende Stoffe gelöst, so daß das Mehr oder Weniger sich vielleicht einigermaßen ausgleicht und der erhalten Wert doch einen annähernden Ausdruck für die vorhandenen Lignine liefert.

<sup>4</sup> H. OST u. L. WILKENING: Chem.-Ztg. 1910, **34**, 461; Z. 1911, **22**, 312.

<sup>5</sup> R. WILLSTÄTTER u. L. ZECHMEISTER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1913, **16**, 4201.

<sup>6</sup> J. KÖNIG u. E. RUMP: Z. 1914, **28**, 177.

<sup>7</sup> J. KÖNIG u. E. BECKER: Die Bestandteile des Holzes; Veröffentlichung der Landwirtschaftskammer der Provinz Westfalen 1918, Heft 26.

<sup>8</sup> H. KRULL: Versuche über die Verzuckerung des Holzes. Inaug.-Diss. Danzig 1916.

<sup>9</sup> J. KÖNIG: Neue Verfahren zur chemischen Untersuchung der Futter- und Nahrungsmittel. Berlin: P. Parey 1930.

Verbindungen eingeht, die Lignine beim Auswaschen kolloid mit brauner Farbe in Lösung gehen und die Schwefelsäure sich schwer auswaschen läßt<sup>1</sup>.

Bei dem Verfahren von WILLSTÄTTER und ZECHMEISTER bereitet die Herstellung der Salzsäure von der Dichte 1,21, die bei Eistemperatur erfolgen muß, Schwierigkeiten, ebenso die Aufrechterhaltung dieser Konzentration.

Beim Einleiten von Salzsäure in oder auf die Substanz, die von wasserlöslichen Stoffen, von Fett, Harz und Stärke vorher befreit sein muß, ist je 1 g der Substanz in einem dickwandigen Reagensglase mit 6 ccm Wasser zu übergießen, worauf unter Eiskühlung solange Salzsäure eingeleitet wird, bis die Mischung sich nicht mehr verändert, und dünnflüssig geworden ist. Man läßt dann 24 Stunden stehen, filtriert, wäscht mit Wasser aus usw. — Am wenigsten Handarbeit erfordert das Dämpfen im Autoklaven. Das Verfahren ist aber zur Prüfung der sich bildenden löslichen Stoffe weniger geeignet, weil der gebildete Zucker dabei in starkem Maße wieder zerstört wird.

### 3. Direkte Bestimmung der Cellulose durch Hydrolyse.

A. KIESEL und N. SEMIGANOWSKY<sup>2</sup> fanden, daß man auch die Cellulose durch 2 $\frac{1}{2}$ stündiges Stehenlassen mit der 7—10fachen Menge 80%iger Schwefelsäure, Verdünnen mit je 15 ccm Wasser auf je 1 ccm Schwefelsäure und 5stündiges Erhitzen am Rückflußkühler quantitativ in Glucose überführen kann. Proteinstoffe stören dabei nicht. Glucose und Galaktose wurden durch das Kochen mit Säure nicht zerstört. Von anderen Zuckerarten wurden folgende Mengen wieder gefunden: Mannose 97,7%, Fructose 26,0%, Invertzucker 66,06%, Xylose 72,2%, Arabinose 84,5%.

Für pflanzliche Stoffe wird zur Cellulosebestimmung folgendes Verfahren empfohlen: Der aus dem Untersuchungsgegenstande mit etwa 100 Teilen 2%iger Salzsäure nach 3—5stündigem Erwärmen im Wasserbade zurückbleibende Rückstand wird durch einen GOOCH-Tiegel mit Asbesteinlage filtriert, mit heißem Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen, im lufttrockenen Zustande gewogen, mitsamt Tiegel mit 10 Teilen 80%iger Schwefelsäure übergossen und nach einiger Zeit mit einem Glasstabe mit der Säure verrieben. Nach 2 $\frac{1}{2}$  Stunden werden auf je 1 ccm Schwefelsäure 15 ccm Wasser zugesetzt und 5 Stunden im kochenden Wasserbade erwärmt. Die Flüssigkeit wird darauf neutralisiert, auf eine bestimmte Raummenge aufgefüllt und nach dem Filtrieren in einer abgemessenen Menge die Glucose bestimmt. Das Ergebnis, mal 0,9, liefert die entsprechende Menge Cellulose. — Eine auf übliche Weise hergestellte Rohfaser kann unmittelbar, wie beschrieben, verzuckert werden.

## V. Sonstige stickstofffreie Extraktstoffe.

### A. Bestimmung und Untersuchung der Pektinstoffe.

#### 1. Begriff der Pektinstoffe.

Die Pektinstoffe<sup>3</sup>, als deren eigentlicher Entdecker BRACONNOT (1824) gelten kann, können wir heute auf Grund der älteren Arbeiten von FREMY und MANGIN und anderen, der neueren von A. TSCHIRCH<sup>4</sup>, TH. v. FELLEBERG<sup>5</sup>,

<sup>1</sup> Die Filtration gelingt am leichtesten, wenn die ganze Masse nach Verdünnen mit Wasser einige Stunden gekocht wird, wobei die Abbauprodukte der Cellulose weiter hydrolysiert werden.

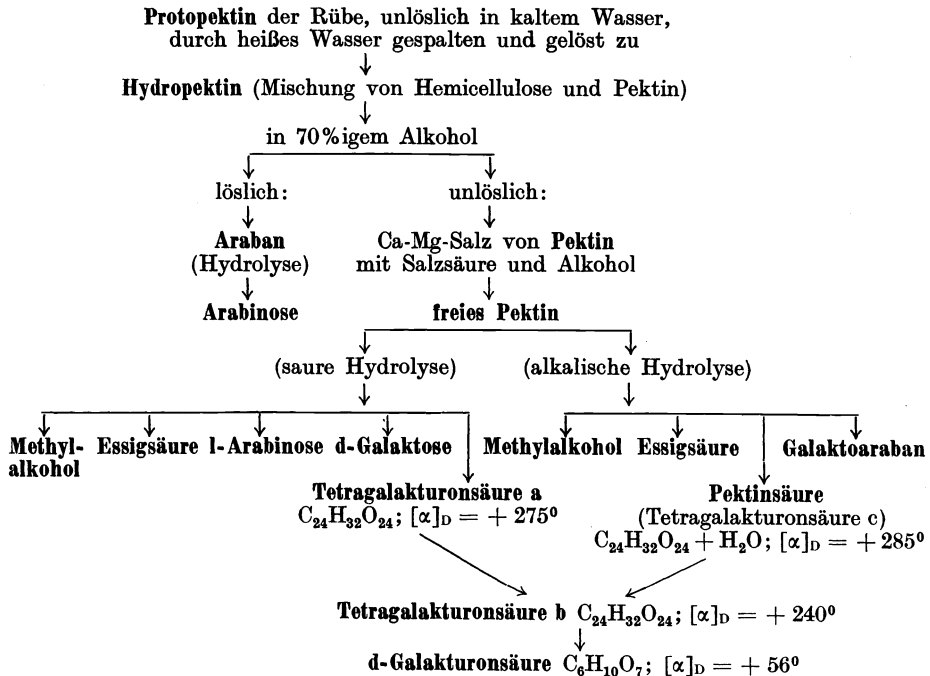
<sup>2</sup> A. KIESEL u. N. SEMIGANOWSKI: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1927, 60, 333.

<sup>3</sup> Die Benennung stammt von *πηκτος* = geronnen.

<sup>4</sup> A. TSCHIRCH u. ROSENBERG: Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 1907, 17, 237; TSCHIRCH: Die Chemie und Biologie der pflanzlichen Sekrete, 1908.

<sup>5</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1914, 5, 225; Z. 1916, 32, 328.

F. EHRLICH<sup>1</sup>, S. SCHRIJVER<sup>2</sup>, D. NANJI<sup>3</sup>, M. H. CARRÉ<sup>4</sup>, F. TUTIN<sup>5</sup>, R. SUCHÁŘKA<sup>6</sup> und deren Mitarbeitern, sowie von A. C. SLOEP<sup>7</sup> und anderen als aus Tetragalakturonsäure (Pektinsäure) in Verbindung mit Galaktose, Arabinose, Methylalkohol, einige auch mit Essigsäure aufgebaute Körper ansehen, die in der Pflanzenwelt, an Pentosane oder Hemicellulosen gebunden, außerordentlich weit verbreitet sind und wahrscheinlich den Mutterstoff des Lignins bilden. Wenn wir unter Benutzung der meist üblichen Bezeichnungen an Hand der Untersuchungen von EHRLICH uns ein Bild der Aufspaltung des Rübenpektins machen wollen, benutzen wir vorteilhaft folgendes Schema nach EHRLICH<sup>8</sup>:



Dieses Schema deutet gleichzeitig den Gang der Pektinuntersuchung an. Im einzelnen sei hierzu noch folgendes bemerkt:

a) Das Protopektin (von EHRLICH „Pektin“ genannt) besteht bei Rübenpektin aus einer Verbindung von Pektin mit Araban, bei Citruspektin nach SUCHÁŘKA aus Pektin mit Cellulose bzw. Hemicellulose. Nach F. W. NORRIS und S. B. SCHRIJVER<sup>9</sup> erhält man Protopektin (Pektinogen) durch Extraktion mit warmer 0,5%iger Lösung von Oxalsäure oder Ammoniumoxalat. Je kürzer die Extraktionsdauer ist, um so reiner kann das Protopektin erhalten werden.

<sup>1</sup> F. EHRLICH: Chem.-Ztg. 1917, 41, 197; Z. 1917, 34, 296. — Zeitschr. angew. Chem. 1927, 40, 1305.

<sup>2</sup> S. B. SCHRIJVER u. D. HAYNES: Biochem. Journ. 1916, 10, 539; Z. 1922, 44, 100.

<sup>3</sup> D. R. NANJI, F. J. PATON and A. R. LING: Journ. Soc. chem. Ind. 1925, 44, 233; C. 1925, II, 394.

<sup>4</sup> M. H. CARRÉ u. D. HAYNES: Biochem. Journ. 1922, 16, 60; C. 1922, IV, 615.

<sup>5</sup> F. TUTIN: Biochem. Journ. 1921, 15, 494; 1923, 17, 83, 510.

<sup>6</sup> R. SUCHÁŘKA: Die Pektinstoffe. Braunschweig 1925.

<sup>7</sup> A. C. SLOEP: Onderzoekingen over Pektinstoffen en hare enzymatische Ontleding. Dissert. Delft 1928.

<sup>8</sup> EHRLICH: Unter Abänderung der Bezeichnungen gemäß den folgenden Ausführungen.

<sup>9</sup> F. W. NORRIS u. S. B. SCHRIJVER: Biochem. Journ. 1925, 19, 676; Z. 1930, 59, 118.

b) Die Essigsäure findet sich nicht in allen Pektinen. EHRLICH fand davon in Rübenpektin 11–12%, in Flachspektin 8,6%. E. K. NELSON<sup>1</sup> konnte in Citronen-, Apfel- und Tomatenpektin keine Essigsäure nachweisen; in Rübenpektin fand er 6%. Auch SLOEP fand in Citruspektin keine Essigsäure.

c) Der Methoxylgehalt der Pektinstoffe unterliegt ebenfalls gewissen Unterschieden je nach Art des Pektins. Im allgemeinen sind nach v. FELLEBERG die vollmethoxylierten Pektine (mit bis zu 11,5% Methylalkohol<sup>2</sup>) die gelierkräftigsten. Der Methoxylgehalt ist daher eine wichtige Kennzahl bei der technischen Bewertung der Pektine. So beziehen C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>3</sup> den Methoxylgehalt auf die Calciumpektatmenge (S. 950) der Alkoholfällung und finden für die Gelierkraft nach LÜERS und LOCHMÜLLER:

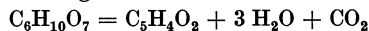
|                 |       |       |       |       |        |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Methoxylgehalt: | 10,55 | 10,75 | 11,36 | 12,46 | 12,65% |
| Gelierkraft:    | 128   | 190   | 255   | 267   | 321    |

Wie A. MEHLITZ<sup>4</sup> jedoch zeigt, ist dieser Vergleich nur für Pektine gleicher Herkunft, z. B. für Apfelpektin, wie es GRIEBEL und WEISS untersuchten, zulässig, da z. B. das sehr gelierkräftige Citruspektin auf diese Weise einen niedrigeren Methoxylgehalt (10,27%) ergibt. MEHLITZ zieht daher die Berechnung auf aschefreies Trockenpektin vor und erhält für

|                 |              |             |                        |
|-----------------|--------------|-------------|------------------------|
| Pektin:         | Citruspektin | Apfelpektin | Gealtertes Apfelpektin |
| Methoxylgehalt: | 9,81         | 8,61        | 7,99%                  |

d) Die Pektinsäure (Tetragalakturonsäure nach EHRLICH), der wichtigste Baustein des Pektinmoleküls, wird nach dem Vorgange von CARRÉ und HAYNES<sup>5</sup> durch Einwirkung von Alkali aus dem Pektinmolekül sehr leicht abgespalten, entmethoxyliert und dann als Calciumsalz gefällt und zur Wägung gebracht. Die Arbeitsweise selbst wurde von C. GRIEBEL<sup>6</sup> und von A. MEHLITZ<sup>7</sup> in ähnlicher Weise für den praktischen Gebrauch abgeändert.

e) Die Galakturonsäure wurde als Baustein des Pektinmoleküls zuerst von EHRLICH<sup>8</sup> erkannt; sie ist bei der Oxydation die Zwischenstufe zwischen Galaktose und Schleimsäure. Durch Oxydation kann sie, wenn auch in schlechter Ausbeute in letztere übergeführt werden. Beim Erhitzen mit Mineralsäuren spaltet sie nach der Gleichung



Kohlendioxyd ab, das ebenso wie das gebildete Furfurol gemessen werden kann. Auch dieser Vorgang verläuft zwar nicht quantitativ, doch fanden F. EHRLICH und F. SCHUBERT<sup>9</sup>, daß ein Teil Furfurolphloroglucid 2,97 Teilen freier Galakturonsäure entspricht, was von A. C. SLOEP, die den Faktor 2,94 fand, bestätigt wurde. Letztere stellte auch fest, daß die Kohlendioxydabspaltung ziemlich konstant zu 88,3% des theoretischen Wertes erhalten werden kann. EHRLICH und SCHUBERT<sup>10</sup> geben in einer weiteren Arbeit einen ausführlichen Einblick in die Struktur der Galakturonsäuren.

<sup>1</sup> E. K. NELSEN: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, 49, 2945. — Nach SLOEP, S. 948.

<sup>2</sup> v. FELLEBERG (Biochem. Zeitschr. 1918, 85, 118) gibt die Pektinformel zu  $C_{62}H_{96}O_{52}(COOCH_3)_n(COOH)_{8-n}$  an, wobei je nach Hydrolysegrad  $n$  alle Werte von 0–8 annehmen kann. So berechnen sich dann für  $n = 8$  11,94,  $n = 7$  10,50,  $n = 6$  9,07,  $n = 5$  7,61% Methylalkohol.

<sup>3</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Z. 1929, 18, 194.

<sup>4</sup> A. MEHLITZ: Konserven-Ind. 1930, 17, 624, 640, 654, 671.

<sup>5</sup> CARRÉ u. HAYNES: Biochem. Journ. 1922, 16, 60; C. 1922, IV, 615.

<sup>6</sup> C. GRIEBEL: Vgl. Z. 1927, 54, 175; 1929, 58, 197; die Vorschrift ist seit etwa 1924 in der Preußischen Landesanstalt für Lebensmittel-, Arzneimittel- und gerichtliche Chemie in Berlin in Anwendung.

<sup>7</sup> A. MEHLITZ: Konserven-Ind. 1925, 12, 73, 86, 123.

<sup>8</sup> EHRLICH: Chem.-Ztg. 1917, 41, 197.

<sup>9</sup> F. EHRLICH u. F. SCHUBERT: Biochem. Zeitschr. 1926, 169, 13; C. 1929, II, 2670.

<sup>10</sup> F. EHRLICH u. F. SCHUBERT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, 62, 1974.

## 2. Nachweis und Bestimmung des Pektins.

### a) Nachweis des Pektins.

Ein außerordentlich empfindliches Fällungsmittel des Pektins fand C. GRIEBEL<sup>1</sup> in einem, den Gerbstoff gerbstoffreicher Fruchtsäfte begleitenden Kolloid, das mit Pektin noch in stärkster Verdünnung eine deutliche Trübung (Ausflockung) wenn auch keine quantitative Ausfällung, liefert. Als Reagens dient vorteilhaft der Saft aus Speierlingen (*Pirus domestica*) oder aus Elsebeeren (*Pirus* [*Sorbus*] *torminalis*).

α) *Bereitung des Reagens.* Baumreife, noch harte<sup>2</sup> Speierlinge (bzw.) Elsebeeren) werden mit einem Messingmesser geschält, sofort im Wolf zerkleinert und unverzüglich abgepreßt. Die erhaltene trübe Flüssigkeit wird zum Sieden erhitzt und noch heiß filtriert. Das Filtrat wird in dunkle, mit wenig Alkohol ausgespülte Medizinflacshen bis zum Halse gefüllt, zur Haltbarmachung mit einer 0,5 cm hohen Schicht Toluol bedeckt und mit einem Korken verschlossen. Die Lösung scheidet nach einiger Zeit eine Trübung aus, die sich absetzt. Da beim Vermischen mit Wasser eine weitere Trübung entsteht, muß der Saft vor Gebrauch mit dem gleichen (bisweilen auch mit dem 1,5—2fachen) Volumen Wasser vermischt werden. Die sofort einsetzende Trübung setzt sich beim Stehen über Nacht im Eisschrank völlig ab, so daß man durch Filtrieren eine klare, nunmehr als Reagens auf Pektin brauchbare Flüssigkeit erhält, die dann mit weiterem Wasser keine Trübung mehr liefern darf.

β) *Ausführung der Prüfung.* Man bringt je 1 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit in ein Reagensglas von 10 cm Länge und 0,5—0,6 cm lichter Weite und setzt tropfenweise 0,2 ccm des Reagens zu. Bei einem Pektingehalt von 0,1% tritt sofort eine milchige Trübung ein, die nach einiger Zeit sehr fein, mit der Lupe erkennbar, ausflockt. Bei einem Pektingehalt von 0,01% entsteht sogleich eine opalisierende Trübung, die gewöhnlich nicht mehr ausflockt. Als Vergleich setzt man einen blinden Versuch mit destilliertem Wasser an um sich zu vergewissern, daß das Reagens mit Wasser keinerlei Trübung gibt.

Eine weitere Verschärfung der Reaktion gelingt in ähnlicher Versuchsanordnung wie bei der UHLENHUTHSchen Präcipitinreaktion (vgl. S. 685). Man verfährt dabei so, daß man 0,2 ccm des Reagens in ein UHLENHUTH-Röhrchen bringt und 0,5—1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit darüber schichtet, indem man sie aus einer 1 ccm-Pipette an der Wand des etwas schräg gehaltenen Röhrchens langsam herunter laufen läßt. Bei einem Pektingehalt von 0,01% tritt augenblicklich ein weißer Ring auf, den man besonders gut erkennt, wenn man einen schwarzen Karton schräg hinter das Röhrchen hängt. Bei stärkeren Verdünnungen kann das Erscheinen des Ringes bis zu mehreren Minuten dauern. Nach 10 Minuten gibt sich mit gutem Reagens noch 0,01 γ Pektin in 0,5 ccm Untersuchungsflüssigkeit zu erkennen.

Wegen der hohen Empfindlichkeit der Reaktion ist auf Reinheit der Geräte besonders zu achten. So ist für jede Flüssigkeit eine besondere, durch wiederholtes Ausspülen und Einstellen in einen Glaszylinder mit destilliertem Wasser über Nacht zu reinigende Pipette zu verwenden.

### b) Bestimmung des Pektins als Calciumpektat nach C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>3</sup>.

α) *In Marmeladen, Gelees und ähnlichen Fruchtdauerwaren.* 25 g der gut durchmischten Probe (Marmelade, Gelee od. dgl.) werden in warmem Wasser gelöst. Die erhaltene Flüssigkeit filtriert man durch ein Faltenfilter in einen Meßkolben von 500 ccm, wäscht das Filter sorgfältig mit warmem Wasser nach und füllt dann das Filtrat bis zur Marke auf. 100 ccm dieser

<sup>1</sup> C. GRIEBEL: *Z.* 1932, **63**, 291—300.

<sup>2</sup> Geeignet sind auch bereits saftig gewordene Früchte, soweit dieselben noch stark herben Geschmack besitzen. Süßgewordene Früchte sind ungeeignet.

<sup>3</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: *Z.* 1927, **54**, 175, Anmerkung; *Z.* 1929, **58**, 197.

Flüssigkeit (= 5 g Marmelade, Gelee od. dgl.) bringt man in ein Becherglas von 400 ccm Fassungsraum, fügt 100 ccm einer etwa 0,1 N.-Natronlauge hinzu, rührt um und läßt, nachdem man sich von der deutlich alkalischen Reaktion der Flüssigkeit überzeugt hat, bedeckt über Nacht stehen. Dann fügt man 50 ccm einer etwa normalen Essigsäure und nach 5 Minuten 50 ccm einer etwa molaren Calciumchloridlösung hinzu. Nach dem Umrühren läßt man die Mischung eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen, kocht dann etwa eine Minute lang unter wiederholtem Verteilen des ausgeschiedenen Calciumpektates und filtriert noch siedend heiß durch gewöhnliches grobporiges (geripptes) Filtrierpapier. Der Niederschlag wird dann mit etwas heißem Wasser nachgewaschen, in das Becherglas zurückgespült und nach nochmaligem Erhitzen der Mischung bis zum beginnenden Sieden auf ein bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes quantitatives Filter<sup>1</sup> von 9 cm Durchmesser gebracht. Der auf dem Filter gesammelte gelatinöse Niederschlag wird unter öfterer Verteilung bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filter wird sodann 8 Stunden im Wasserdampftrockenschranke getrocknet und gewogen. Hierauf trocknet man erneut, bis der Gewichtsverlust innerhalb 2 Stunden nicht mehr als 0,5 mg beträgt.

Das Vortrocknen erfolgt auf dem Trichter, wobei man zur Verhütung des Anklebens das Filter zunächst etwa 1 cm in die Höhe zieht, so daß es nur noch einseitig dem Trichter anliegt. Erst wenn es fast trocken ist, kommt es in das Wägegöläschen.

Bei Anwendung von 5 g Substanz ergibt das Gewicht des Niederschlages, mal 20, den Prozentgehalt an Pektinstoffen, als Calciumpektat berechnet.

Beträgt das Gewicht des erhaltenen Niederschlages mehr als 0,05 g oder weniger als 0,02 g, so ist die Bestimmung mit einer entsprechend geringeren oder größeren Materialmenge zu wiederholen.

β) Von flüssigen Pektinpräparaten des Handels verdünnt man in einem Becherglase von 400 ccm Fassungsraum etwa 1 g mit 20 g Wasser, filtriert, wenn nötig, und wäscht das Filter gut mit Wasser nach. Nunmehr fügt man 100 ccm der 0,1 N.-Natronlauge hinzu und verfährt in gleicher Weise wie bei α) weiter. — Von pulverförmigen Zubereitungen verwendet man 0,1 g.

γ) Bestimmung des Pektins in der Alkoholfällung eines Pektinpräparates. Je nach der Konzentration des Präparates werden 15–30 g der Flüssigkeit, nötigenfalls nach Verdünnung mit etwas Wasser, filtriert. Das Filtrat wird mit der zehnfachen Raummenge 96%igen Alkohols (3 Tropfen Salzsäure auf 100 ccm Alkohol) unter sorgfältigem Umrühren versetzt, wobei der Alkohol zunächst langsam hinzugegeben wird, bis die anfangs zähe Ausscheidung mit weiteren Alkoholmengen zu einem gleichmäßigen dünnflüssigen Gemisch verrührt werden kann.

Nach Zusatz der gesamten Alkoholmenge läßt man einige Stunden (am besten über Nacht) stehen und rührt mehrmals um. Alsdann saugt man die fast klare alkoholische Flüssigkeit durch ein gehärtetes Filter, bringt schließlich die gesamte Fällung auf das Filter, wäscht mit etwas 90%igem Alkohol nach und entfernt hierauf den Alkohol möglichst vollständig durch kräftiges Saugen und Zusammendrücken der Fällung mit einem abgeplatteten Glasstab. Nunmehr wird die Fällung auf der Nutsche mit Äther sorgfältig verrührt und letzterer abgesogen. Diese Behandlung ist noch 1–2mal zu wiederholen. Der durch Absaugen möglichst vollständig vom Äther befreite Rückstand wird mit 15 bis 30 ccm Wasser (entsprechend der angewendeten Menge Pektinpräparat) versetzt und unter Umrühren auf einem schwach geheizten Wasserbade auf höchstens

<sup>1</sup> Z. B. von Schleicher & Schüll, Nr. 589.



50° erwärmt, bis die Fällung vollständig gelöst ist. Aus dieser Lösung fällt man das Pektin nochmals mit der 10fachen Menge salzsauren 96%igen Alkohols in der oben angegebenen Weise. Nach nochmaligem Stehen über Nacht saugt man den Alkohol ab und wäscht den Niederschlag reichlich mit Äther, bis der Rückstand als feinflockige oder feinpulverige, fast trockene Masse erhalten wird, so daß kleine Proben beim Pressen zwischen den Fingern nicht mehr zusammenballen. Die Fällung wird schließlich in ein flaches Wägegläschen gebracht und in einem Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dieses Trocknen kann durch vorheriges halbstündiges Erwärmen der Fällung auf 50° wesentlich beschleunigt werden.

0,05—0,06 g der wie vorstehend erhaltenen Alkoholfällung werden in etwa 20 ccm Wasser, erforderlichenfalls unter Erwärmen, gelöst. Hierbei häufig entstehende Klümpchen sind mit Hilfe eines Glasstabes zu zerdrücken. Nach vollständiger Lösung wird in der unter  $\alpha$ ) angegebenen Weise die Pektinmenge als Calciumpektat ermittelt.

Die Hydrolyse des Pektins durch Natronlauge erfolgt bereits in der Kälte außerordentlich leicht. A. MEHLITZ<sup>1</sup> verfolgt die beim Vermischen von 5 g Apfelpektinlösung mit 100 ccm 0,1 N.-Natronlauge eintretende Verseifung durch Calciumpektatbestimmung und fand, daß bereits nach  $\frac{1}{2}$  Stunde 90,3% des gesamten Pektins verseift waren. Für die folgende Zeit betrug die verseifte Menge:

| nach | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | Stunden |
|------|------|------|------|------|------|------|---------|
|      | 92,0 | 93,8 | 95,4 | 96,5 | 98,2 | 100% |         |

C. F. AHMANN und H. D. HOOKER<sup>2</sup> bauen auf diesem Verseifungsvorgange eine alkalimetrische Pektinbestimmung durch Titration auf: Zu einer Lösung von 0,25—1,00 g Pektin in 200 ccm Wasser gibt man aus einer Bürette soviel 0,4—0,5 N.-Natronlauge bekannter Konzentration, bis die Mischung etwa 0,1 normal ist. Man füllt auf und läßt 12 Stunden bei 55° unter Verschuß stehen. In einem Teil der abpipettierten Flüssigkeit titriert man das ungebundene Alkali mit Salzsäure zurück. Dann verhält sich: NaOH (40) : Pektin (208,9) = gebundenes Alkali: X.

Eine Schnellmethode zur Bestimmung der Pektinsäure bestehend in einer Abscheidung derselben mit Salzsäure, Abschleudern, 15 Minuten bei 2400—2500 Umdrehungen und Ablesung des Volumens beschreiben C. R. FELLERS und C. C. RICE<sup>3</sup>.

### c) Bestimmung des Methoxylgehaltes von Pektin.

$\alpha$ ) Das Jodidverfahren von ZEISEL. Dieses beruht darauf, daß beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure Methyljodid entwickelt und in alkalische Silbernitratlösung geleitet wird, wo es eine entsprechende Menge Silberjodid ausfällt, das dann gewogen wird. Erforderlich sind für den Versuch trockenes Pektinpulver, das in geeigneter Weise etwa durch Ausfällung mit Alkohol nach  $\beta$  und vollständige (!) Trocknung aus der vorliegenden Pektinlösung darzustellen ist. Etwa 0,10—0,12 g des Pulvers werden im Siedekölbchen des bei der Weinuntersuchung gebräuchlichen Jodidapparates nach M. J. STRITAR in der Abänderung von VON DER HEIDE<sup>4</sup> mit 10 ccm Jodwasserstoffsäure (Dichte 1,96) vermischt, so daß keine zusammenhängenden Klumpen mehr vorhanden sind. In das Waschgefäß des Apparates bringt man 5 ccm einer wäßrigen Aufschwemmung von etwas rotem Phosphor<sup>5</sup> und in die Vorlage 50 ccm alkoholische 4%ige

<sup>1</sup> A. MEHLITZ: Konserven-Ind. 1925, 12, 607; Z. 1930, 60, 351.

<sup>2</sup> C. F. AHMANN u. H. D. HOOKER: Journ. Ind. Engin. Chem. 1926, 18, 412; Z. 1930, 60, 351.

<sup>3</sup> C. R. FELLERS u. C. C. RICE: Ind. Engin. Chem. Analyt. Edition 1932, 4, 268.

<sup>4</sup> VON DER HEIDE: Berichte der Lehranstalt Geisenheim 1908; nach MEHLITZ: Konserven-Ind. 1930, 17, Sonderabdruck S. 4.

<sup>5</sup> Die Brauchbarkeit des Phosphors ist durch einen blinden Versuch festzustellen. Bildet sich hierbei in der Zersetzungsvorrichtung ein schwarzer Beschlag — ein leicht brauner Anflug kann vernachlässigt werden — so ist der Phosphor in folgender Weise zu reinigen: 10 g roter Phosphor werden in einer braunen Flasche mit etwa 500 ccm Wasser übergossen und nach dem Absetzen mit 10 ccm einer wäßrigen Jod-Kaliumjodidlösung, die

Silbernitratlösung. Hierauf wird in das Rohr des Siedekölbchens gewaschenes und getrocknetes Kohlendioxyd — etwa drei Blasen in der Sekunde — eingeleitet und der Inhalt des Kölbchens mittels eines Paraffinbades zum langsamen Sieden gebracht. Durch Regelung des Siedens ist dafür zu sorgen, daß die Phosphoraufschwemmung handwarm ist. Nach etwa zweistündigem Sieden wird die Destillation unterbrochen und die Menge des gebildeten Jodsilbers in der üblichen Weise ermittelt.

1 g Jodsilber entspricht 0,1321 g  $\text{CH}_3\text{O}$ .

F. VIEBÖCK und A. SCHWAPPACH<sup>1</sup> verwenden bei diesem Verfahren als Absorptionsflüssigkeit statt der Silbernitratlösung eine Lösung von Brom in Eisessig unter Zusatz von etwas Natrium- oder Kaliumacetat. Die aus dem Methyljodid entstehende Jodsäure wird nach Zusatz von Kaliumjodid mit  $\frac{1}{30}$  N.-Natriumthiosulfatlösung bestimmt. Besondere Vorzüge dieser Abänderung sind nach Angabe der Autoren starke Herabsetzung der Einwaaage (4—5 mg), Ersparnis an Jodwasserstoffsäure und Unempfindlichkeit gegen Schwefelwasserstoff und Phosphorwasserstoff. Mit weniger als 1 mg Substanz erhält man nach VIEBÖCK und C. BRECHER<sup>2</sup> noch genaue Ergebnisse, wenn man mit 0,01 N.-Thiosulfatlösung titriert. Bezüglich der genauen Ausführung des Verfahrens sei auf das Original verwiesen. — A. FRIEDRICH<sup>3</sup> benutzt statt der Aufschwemmung des roten Phosphors 3%ige Natriumthiosulfatlösung und schlägt als Korrektur für ungenügende Umsetzung des Jodalkyls mit dem Silbernitrat Addition von je 0,06 mg Silberjodid für je 1 ccm Lösung vor. Nach einer anderen Vorschrift von FRIEDRICH wird das gebildete Jodalkyl mittels Luft in ein Mikroverbrennungsrohr nach PREGL geleitet und das entstehende Kohlendioxyd in üblicher Weise im Natronkalkrohr aufgefangen und gewogen. G. M. WARE<sup>4</sup> erhielt hiernach in allen Fällen erst dann gute Ergebnisse, wenn Jodwasserstoffsäure der Dichte 1,96 (statt 1,70) verwendet, das Kohlendioxyd durch Silbernitratlösung von Schwefelwasserstoff gereinigt und eine Phosphoraufschwemmung in 10%iger Cadmiumsulfatlösung benutzt wurde.

Nach dem vorstehenden Verfahren von ZEISEL werden neben der Methoxyl- auch die Äthoxylgruppe bzw. höhere Alkoxygruppen, wenn auch weniger vollständig, mitbestimmt, wenn solche vorhanden sind. Die Siedepunkte der Jodalkyle<sup>5</sup> betragen nämlich für:

|            |             |            |               |              |
|------------|-------------|------------|---------------|--------------|
| Jodalkyl   | Methyljodid | Äthyljodid | n-Propyljodid | n-Butyljodid |
| Siedepunkt | 43°         | 72°        | 102°          | 130°         |

Von diesen ist die Reaktionsfähigkeit beim Methyljodid am größten.

Eine Trennungsmöglichkeit von Methyl- und Äthyljodid haben R. WILLSTÄTTER und M. UTZINGER<sup>6</sup> angegeben. Sie führen das Jodalkyl mit einer alkoholischen Lösung von Trimethylamin in Tetramethylammoniumjodid bzw. Trimethyläthylammoniumjodid über, von denen ersteres in absolutem Alkohol fast unlöslich, letzteres sehr leicht löslich ist. Andere Bestimmungsmöglichkeiten bestehen darin, daß man das Methyljodid durch Verseifung in Methylalkohol umwandelt und diesen dann colorimetrisch bestimmt. A. FRIEDRICH<sup>7</sup> bestimmt Methoxyl neben Äthoxyl durch Verbrennung der Jodide im Verbrennungsrohr auf Grund ihres verschiedenen Kohlenstoffgehaltes.

$\beta$ ) Bestimmung des Pektin-Methylalkohols nach TH. v. FELLEBERG<sup>8</sup>.  $\alpha\alpha$ ) Bei Lebensmitteln bringt man 1—2 g des zu prüfenden (bei

5% freies Jod enthält, versetzt. Darauf wird sofort kräftig umgeschüttelt. Man wiederholt das Zusetzen der Jodlösung nach jedesmaligem Absetzen des Phosphors und das Umschütteln etwa 10mal. Nach dem Abheben der überstehenden Lösung und dreimaligem Auswaschen mit Wasser ist der Phosphor gebrauchsfertig. (Nach der amtlichen Anweisung zur Untersuchung des Weines.)

<sup>1</sup> F. VIEBÖCK u. A. SCHWAPPACH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 2818; C. 1930, II, 3609.

<sup>2</sup> F. VIEBÖCK u. C. BRECHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1930, 63, 3207; C. 1931, I, 322.

<sup>3</sup> A. FRIEDRICH: Zeitschr. physiol. Chem. 1927, 163, 141; Z. 1930, 60, 445.

<sup>4</sup> G. M. WARE: Mikrochemie 1931, 8, 352; C. 1931, I, 3705.

<sup>5</sup> Nach BEILSTEINS Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl., 1. Band.

<sup>6</sup> M. UTZINGER: Liebigs Ann. 1911, 382, 129; C. 1911, II, 1142.

<sup>7</sup> A. FRIEDRICH: Mikrochemie 1929, 7, 185.

<sup>8</sup> TH. v. FELLEBERG: Biochem. Zeitschr. 1918, 85, 68. — Unter Berücksichtigung späterer Abänderungen.

Gewürzen vorher entfetteten) Stoffes in einen 400 ccm-Kolben, fügt 40 ccm Wasser hinzu und destilliert zunächst unter Verwendung eines senkrechten Kühlers 20 ccm davon ab, wodurch die letzten Spuren von ätherischen Ölen entfernt werden. Bei stärkereichen Stoffen unterläßt man die Destillation und setzt nur 20 ccm Wasser hinzu. Der Rückstand wird noch heiß (bei 80 bis 90°) mit 5 ccm 10%iger Natronlauge versetzt, der Gummistopfen mit dem Verbindungsrohr sogleich wieder aufgesetzt und der Kolben nach gründlichem Umschwenken 5 Minuten stehen gelassen. Nun werden 2,5 ccm verd. Schwefelsäure (1 + 4) hinzugefügt und 17 ccm abdestilliert. Das Destillat wird in einen neuen Kolben von 50 ccm gebracht, mit 5 Tropfen Natronlauge und 5 Tropfen 10%iger Silbernitratlösung versetzt und wieder destilliert, bis 11 ccm übergegangen sind. Durch eine letzte Destillation auf einem 30 ccm-Kolben gewinnt man ein Destillat von 7 ccm, dessen Gewicht man auf 2 Dezimalen genau feststellt. Darin bestimmt man den Gehalt an Methylalkohol colorimetrisch mit Fuchsinschweflige Säure.

ββ) Von Pektinstoffen<sup>1</sup> bringt man 0,16–0,20 g in einem 100 ccm-Destillierkolben mit seitlichem Ansatzrohr in 20 ccm Wasser restlos in Lösung (nötigenfalls auf einem auf 50° erwärmten Wasserbade). Zur Verseifung des Pektins werden dann 5 ccm 10%ige Natronlauge zugesetzt, sofort vorsichtig umgeschüttelt<sup>2</sup> und der Kolben sofort mit Gummistopfen verschlossen. Nach 5 Minuten werden 2,5 ccm der verd. Schwefelsäure zugefügt und nochmals vorsichtig umgeschüttelt. Dann wird der Kolben mittels Gummistopfen sofort an einen Kühler angeschlossen. Nun werden 17 ccm abdestilliert. Das Destillat wird in einen neuen 50 ccm-Kolben gebracht, mit je 5 Tropfen 10%iger Natronlauge und Silbernitrat versetzt und wie oben weiter verfahren.

γγ) Zur Bestimmung des Lignin-Methoxyls durch Überführung in Methylalkohol hat TH. v. FELLEBERG<sup>3</sup> ebenfalls eine Vorschrift angegeben, auf die hier verwiesen sei.

Bezüglich der colorimetrischen Methylalkoholbestimmung sei auf die Vorschrift von v. FELLEBERG (vgl. unter αα) verwiesen, der dafür auch Hilfstabellen angegeben hat, während A. MEHLITZ<sup>4</sup> zu dem Zweck eine besondere Eichungskurve benutzt.

MEHLITZ fand bei vergleichenden Versuchen, daß die Fehlergrenze nach der Jodidmethode und der colorimetrischen fast die gleiche war ( $\pm 2,5\%$  bzw.  $2,8\%$ ).

γ) In etwas abgeänderter Weise empfehlen D. R. NANJI und A. G. NORMAN<sup>5</sup> den mittels Lauge angespaltenen Methylalkohol durch Destillation abzutrennen und das Destillat durch Permanganat zu oxydieren. Eine Pektinlösung mit höchstens 0,05 g Pektin versetzt man mit 100 ccm 0,1 N.-Natronlauge, läßt über Nacht in geschlossener Flasche stehen, neutralisiert alsdann bis etwa zum  $p_H = 4,5$  und destilliert  $\frac{9}{10}$  der Flüssigkeit über. Als dann bringt man 100 ccm Kaliumpermanganatlösung (9,75 g/l), 40 ccm Natriumhydroxydlösung (150 g/l) in einen ERLÉNMEYER-Kolben von 500 ccm Inhalt, setzt zu diesem Gemische die verdünnte Methylalkohollösung, die höchstens 10 mg Methylalkohol enthalten darf, und kocht nach dem Mischen 3 Minuten am Rückflußkühler. Darauf fügt man noch heiß 100 ccm Oxalsäurelösung (20 g/l) und 40 ccm verd. Schwefelsäure (2 Vol. Schwefelsäure + 5 Vol. Wasser) hinzu. Nach dem Umschütteln wird der Oxalsäureüberschuß mit 0,05 N.-Kaliumpermanganatlösung zurücktitriert. — Das Ergebnis eines Leerversuches ohne Methylalkohol ist abzuziehen. Alle verwendeten Kolben, Pipetten usw. sind vorher durch Auskochen mit alkalischer Permanganatlösung zu säubern. 1 ccm 0,05 N.-KMnO<sub>4</sub> entspricht 0,267 mg CH<sub>3</sub>OH und 0,259 mg CH<sub>3</sub>O.

<sup>1</sup> Vgl. A. MEHLITZ: Konserven-Ind. 1930, 17, 624.

<sup>2</sup> Damit Bildung einer festen Gallerte vermieden wird.

<sup>3</sup> TH. v. FELLEBERG: Biochem. Zeitschr. 1918, 85, 103.

<sup>4</sup> A. MEHLITZ: Konserven-Ind. 1930, 17, 624.

<sup>5</sup> D. R. NANJI u. A. G. NORMAN: Journ. Soc. chem. Ind. 1926, 45, 337.

d) Nachweis und Bestimmung der Galakturonsäure  
(Glucuron-, Galakturon- und Aldehyd-Schleimsäure<sup>1</sup>).

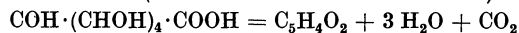
α) Für den Nachweis der Glucuronsäuregruppe verfährt A. W. VAN DER HAAR<sup>2</sup>, wie folgt: αα) 1 g des Stoffes wird mit 10 ccm 5%iger Schwefelsäure (nötigenfalls unter Zusatz von Alkohol oder mit 2%iger Schwefelsäure im Autoklaven bei 130<sup>0</sup> hydrolysiert. Die trübe Flüssigkeit wird mit Barytwasser gegen Kongopapier neutralisiert, filtriert, ausgewaschen und das Filtrat auf einige Kubikzentimeter auf dem Wasserbade eingeengt. Nach Abkühlung wird ein geringer Überschuß an neutralem Bleiacetat zugegeben, filtriert und das Filtrat mit Bleiessig versetzt. Nach 24 Stunden wird auf einem Saugfilter gesammelt und der Niederschlag mit Wasser ausgewaschen. Dieser Niederschlag wird in 10 ccm 19%iger Salzsäure gelöst, mit mindestens 100 mg Naphthoresorcin 1 Minute in gelindem Sieden gehalten, einige Minuten gewartet und die Flüssigkeit bei etwa 50<sup>0</sup> mit 5–10 ccm Benzol<sup>4</sup> tüchtig ausgeschüttelt. Das abgetrennte, nötigenfalls mit wasserfreiem Natriumsulfat geklärte Benzol ist im positiven Falle violett gefärbt und erzeugt im Spektralapparat einen dunklen Streifen auf der D-Linie. — VAN DER HAAR beobachtete in einem Falle (bei Traganthgummi) ein Ausbleiben der Reaktion bei Gegenwart von Galakturonsäure, bedingt durch einen in Alkohol löslichen Körper. Bei negativem oder zweifelhaftem Ausfall empfiehlt sich also eine Wiederholung der Reaktion, indem man die Bariumcarbonatmasse zunächst mit Alkohol auskocht, dann mit Wasser auszieht, diesen Auszug wie oben mit Schwefelsäure ansäuert, bis nur noch wenig Bariumsalz gelöst ist, dann nach Vorbehandlung mit neutralem Bleiacetat mit basischem Bleiacetat wie oben fällt. Bei Galakturonsäure scheint sich das Benzol weniger gut zu färben als mit Glucuronsäure, weil öfter erhitzt und geschüttelt werden mußte.

ββ) Mischt man ferner einen oder mehrere Tropfen des Hydrolysensirups in 1 ccm Wasser mit einigen Kubikzentimetern FEHLINGScher Lösung, so tritt, wenn die genannten Säuren vorliegen, nach VAN DER HAAR<sup>5</sup> fast sofort beginnende Reduktion auf. — Diese Erscheinung wird durch kein anderes Monosaccharid hervorgerufen; Fructose (S. 851) reduziert schwach erst nach 30–60 Minuten, die anderen reduzieren nicht. Nur bei Kastaniensamensaponin beobachtete VAN DER HAAR eine sofortige Reduktion durch einen unbekanntem Stoff, der nicht der Glucuronsäuregruppe angehörte.

γγ) Zur Unterscheidung von Glucuronsäure und Galakturonsäure (bzw. Aldehydschleimsäure) oxydiert man mit Salpetersäure, wobei im ersteren Fall Zuckersäure (S. 851), im anderen Falle Schleimsäure (S. 854) entsteht. Nach EHRLICH<sup>6</sup> wird die d-Galakturonsäure mit Brom auch bei gewöhnlicher Temperatur zu Schleimsäure oxydiert, dagegen die Galaktose erst bei höherer Temperatur.

β) Zur Bestimmung der Galakturonsäure dienen:

αα) Die Überführung in Furfurol nach S. 855. Beim Erhitzen mit Säuren geht die Galakturonsäure (ebenso wie die Glucuronsäure) nach der Gleichung



<sup>1</sup> Diese Säure soll nach M. L. SUAREZ (Chem.-Ztg. 1917, 41, 87) gebunden in Citronen vorkommen.

<sup>2</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 300. — Vgl. Biochem. Zeitschr. 1918, 88, 205; C. 1918, II, 475. — Die Reaktion wurde zuerst von TOLLENS (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, 41, 1788; C. 1908, II, 448) angegeben, ist aber bei der von diesem angegebenen Ausschüttelung mit Äther nicht spezifisch.

<sup>3</sup> Manche glucuronsäurehaltige Stoffe lassen sich sonst schwer spalten.

<sup>4</sup> Nach C. NEUBERG u. S. SANÉYOSHI (Biochem. Zeitschr. 1911, 16, 56), die vom Osazon ausgehen.

<sup>5</sup> VAN DER HAAR: Anleitung S. 301. <sup>6</sup> Vgl. Chem.-Ztg. 1917, 41, 197.

unter Abspaltung von Wasser und Kohlendioxyd in Furfurol über. Die Reaktion verläuft zwar nicht quantitativ, doch entspricht nach F. EHRlich und F. SCHUBERT<sup>1</sup> ein Teil Furfurolphloroglucid 2,94 Teilen freier Galakturonsäure. A. C. SLOEP<sup>2</sup> fand diesen Faktor zu 2,95 und 2,98, im Mittel zu 2,97.

β) Die Kohlensäuremethode nach K. LEFÈVRE und B. TOLLENS<sup>3</sup>. Die ursprüngliche Vorschrift wurde von A. W. VAN DER HAAR<sup>4</sup> (Anschaltung an die Saugpumpe statt Aspirator aus Flaschen), D. NANJI, F. PATON und A. LING<sup>5</sup>, die das Kohlendioxyd statt es zu wägen, in Barytwasser absorbieren und titrieren, C. GRIEBEL und P. CASAL<sup>6</sup>, die zum Aufschlußgemisch etwas grobes Bimssteinpulver und zur Vermeidung des Schäumens 1 ccm Amylalkohol zusetzen, schließlich von A. C. SLOEP<sup>7</sup> verbessert. Letztere schaltete zur Absorption der letzten störenden Mengen Furfurol eine Waschflasche mit gesättigter Phloroglucin-

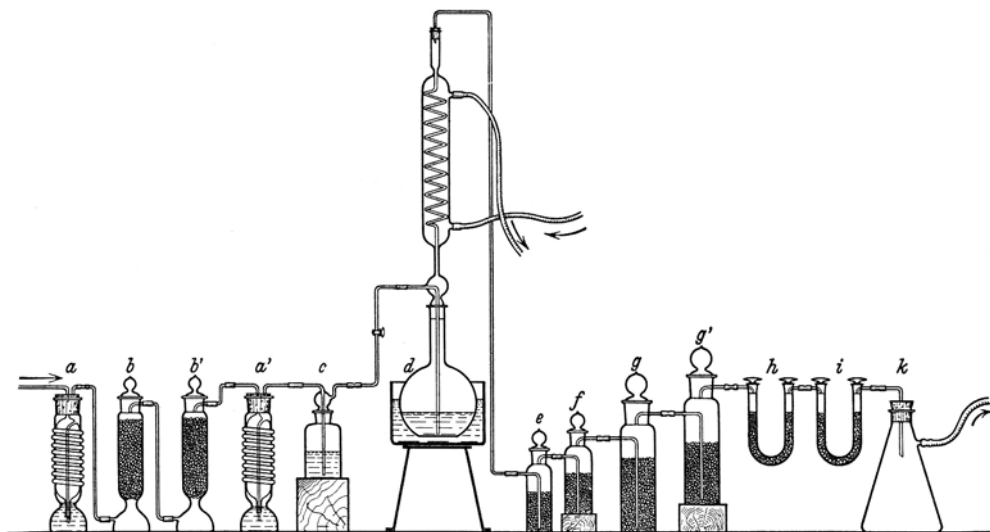


Abb. 16. Apparat zur Bestimmung des aus „Uronsäuren“ abspaltbaren Kohlendioxyds.

lösung in Salzsäure und anschließend eine Waschflasche mit Silbernitrat ein, um die flüchtige Salzsäure zu binden. Der Erfolg war, daß die sonst eintretende Gelbfärbung des Barytwassers ausblieb. SLOEP stellte ferner fest, daß erst nach langem Erhitzen (4 Stunden) die Abspaltung der Kohlensäure beendet ist, und daß bei Galakturonsäure im Gegensatz zur Glucuronsäure das Kohlendioxyd nicht quantitativ, sondern konstant zu im Mittel 88,3% des theoretischen Betrages abgespalten wird.

Die Arbeitsweise von SLOEP ist folgende: Wie die Abb. 16 erkennen läßt, wird bei der Waschflasche a die durchzuleitende Luft in den Apparat gesogen, geht durch a, gefüllt mit 50%iger Kalilauge, zwei Türme b und b', gefüllt mit Natronkalk und a' ebenfalls mit starker Lauge. Die so von der Kohlensäure befreite Luft passiert dann die mit Wasser gefüllte Waschflasche c und gelangt in den Kolben d, in dem sich der zu untersuchende Stoff mit 100 ccm 12%iger Salzsäure befindet. Nach starker Kühlung erreicht das Gas nach Entfernung des Furfurols in der Waschflasche e, die 25 ccm mit Phloroglucin gesättigte Salzsäure enthält, und der Salzsäure in f, mit 25 ccm Silbernitratlösung (1% Salpetersäure, 2% Silbernitrat enthaltend) die Barytwaschflaschen g und g'.

<sup>1</sup> F. EHRlich u. F. SCHUBERT: Biochem. Zeitschr. 1926, 169, 13.

<sup>2</sup> A. C. SLOEP: Onderzoekingen S. 56.

<sup>3</sup> K. LEFÈVRE u. B. TOLLENS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1907, 40, 4513.

<sup>4</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung S. 71.

<sup>5</sup> D. NANJI, F. PATON u. A. LING: Journ. Soc. chem. Ind. 1925, 44, 253.

<sup>6</sup> C. GRIEBEL u. P. CASAL: Z. 1929, 58, 482.

<sup>7</sup> A. C. SLOEP: Onderzoekingen, S. 56—62.

Hierauf folgt noch eine U-Röhre  $h$  mit Barytlösung<sup>1</sup> und eine U-Röhre mit Natronkalk, worauf die Luft den Apparat verläßt.

Bevor der Versuch beginnt, muß die Vorrichtung kohlendioxidfrei gemacht werden. Man bringt zu diesem Zweck den zu prüfenden Stoff (entsprechend 150—250 mg Galakturonsäure)<sup>2</sup> in die im Kolben  $d$  befindliche Salzsäure, wobei aber die Barytflaschen  $g$  und  $g'$ , und  $h$  noch leer sind. Man stellt die Saugpumpe an und öffnet von rechts beginnend alle Hähne und sorgt dafür, daß in  $c$  ungefähr 2—3 Luftblasen in der Sekunde durch die Flüssigkeit gehen. Ohne zu erwärmen, leitet man so etwa 30—45 Minuten Luft durch den Apparat. Dann schließt man rechts angefangen die Hähne bis zum Hahn in dem Rohr vor dem Kolben  $d$  einschließlic.  $g$ ,  $g'$  und  $h$  werden sodann mit Barytlösung<sup>3</sup> beschickt, wobei man dafür sorgt, daß keine kohlendioxidhaltige Luft hinzutreten kann. Dann wird mit dichten Stopfen wieder in den Apparat geschaltet, worauf man von rechts her alle Hähne wieder öffnet. Darauf beginnt man mit dem Erhitzen des Kolbens  $d$  mittels eines Öl- oder Metallbades. In die Flüssigkeit in  $d$  werden einige Siedesteinchen gebracht, um Siedeverzug zu verhindern. Vom Augenblick des Aufkochens an läßt man den Versuch etwa 3—4 Stunden<sup>4</sup> unter kräftigem Sieden gehen.

Beim Abstellen des Apparates schließt man wieder die Hähne von rechts angefangen, löst den Schlauch zwischen  $b'$  und  $a'$  und so weiter alle Schläuche nach rechts, um ein Zurücksteigen der Flüssigkeit zu vermeiden; besonders bei dem Kolben  $d$  muß man vorsichtig sein, da hier noch durch den Dampfdruck die Flüssigkeit in dem Einleitungsrohr in den Kolben steigen kann. Man löst also die Verbindung zwischen  $c$  und  $d$  und sofort darauf zwischen  $e$  und dem Ableitungsrohr. Hähne und Stopfen müssen unbedingt dicht und bei den Schlauchverbindungen<sup>5</sup> Glas an Glas schließen.

Zu den Waschflaschen selbst gibt man vor der Titration je 5 ccm 20%ige Bariumchloridlösung auf je 25 ccm Flüssigkeit und titriert in den Waschflaschen selbst mit 0,1 N.-Salzsäure gegen Phenolphthalein als Indicator zurück. Je 1 ccm gebundene 0,1 N.-Säure (Vorlage minus Überschuß) entspricht 2,20 mg CO<sub>2</sub> oder 8,80 mg C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (Galakturonsäurelacton).

W. H. DORE<sup>6</sup> fand in verschiedenen Handelspektinen nach LEFÈVRE und TOLLENS 39—61% Galakturonsäure, berechnet als C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>.

γγ) Die Schleimsäuremethode wird von TH. KOYDL<sup>7</sup> zur Galaktanbestimmung unter gewissen Abänderungen verwendet, von SLOEP<sup>8</sup> jedoch wegen der schlechten Ausbeute bei Galakturonsäure für ungeeignet gehalten.

#### e) Bestimmung der Gelierkraft mit dem Pektinometer nach H. LÜERS und K. LOCHMÜLLER<sup>9</sup>.

Zunächst wird die zur Kochung angewendete Menge Pektinpräparat

$$x = \frac{0,7 \cdot 100}{p},$$

entsprechend 0,7% gefundenem Calciumpektat errechnet, wobei  $p$  den im

<sup>1</sup> Die Versuche ergaben, daß das Kohlendioxid niemals völlig durch die erste Waschflasche trotz großen Barytüberschusses und Anbringung von Gasperlen in der Flasche absorbiert wurde. In einigen Fällen war auch die Absorption in der 2. Flasche noch nicht vollständig, weshalb die U-Röhre angeschlossen wurde.

<sup>2</sup> Also etwa 250—400 mg Pektin entsprechend.

<sup>3</sup> Z. B.  $g$  mit 40 ccm,  $g'$  mit 25 ccm,  $h$  mit 10 ccm etwa 0,1 N.-Bariumhydroxydlösung.

<sup>4</sup> Bei einigen Pektinstoffen war eine noch längere Kochung (6 Stunden) nötig.

<sup>5</sup> Die Verbindungsschläuche werden nachts über in Wasser mit Glycerin aufbewahrt.

<sup>6</sup> W. H. DORE: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, 48, 232.

<sup>7</sup> TH. KOYDL: Öster.-Ungar. Zeitschr. f. Zuckerind. 1914, 43, 208; Z. 1915, 29, 374.

<sup>8</sup> A. C. SLOEP: Onderzoekingen, S. 62.

<sup>9</sup> LÜERS H. u. K. LOCHMÜLLER: Kolloid.-Zeitschr. 1927, 42, 154. Nach GRIEBEL u. WEISS: Z. 1929, 58, 199.

Präparat ermittelten Betrag an Calciumpektat (%) bedeutet. Wenn weniger als 15 g Pektinpräparat berechnet werden, ergänzt man zu 15 g. Bei größeren Mengen muß man bei der Vorschrift (vgl. unten) mehr Wasser abdestillieren.

Diese Menge Pektinpräparat wird nun mit 100 ccm klarer 42%iger Zuckerslösung (60 g Zucker in 100 ccm,  $D_4^{20} = 1,224$ ) und 0,2 g Weinsäure in einem 500 ccm fassenden Schott-Rundkolben sorgfältig vermischt. Der Hals des Kolbens soll nur etwa 5,5 cm lang sein. Mit Hilfe eines gebogenen Destillationsrohres von mindestens 0,8 cm lichter Weite verbindet man den Kolben mit einem absteigenden Kühler. Als Vorlage dient ein graduierter Zylinder. Nunmehr wird der Kolben in ein genau auf 150° erhitztes und bei dieser Temperatur gehaltenes Paraffinbad gebracht, in das er bis zum Rande seines Flüssigkeitsinhaltes eintauchen soll. Auf diese Weise werden genau 38 ccm Wasser möglichst im Verlauf von 15 Minuten abdestilliert, wenn 15 g Pektinpräparat oder eine auf 15 g ergänzte Flüssigkeitsmenge angewendet worden waren. Müßten mehr als 15 g Pektinpräparat eingewogen werden, so muß außer den 38 ccm noch die über 15 g hinausgehende Flüssigkeitsmenge abdestilliert werden.

Nach Beendigung der Destillation wird die heiße Masse sofort und möglichst vollständig mit Hilfe eines Trichters aus dem Kolben in den Versuchsbecher<sup>1</sup> gegossen. Zuvor ist die Zerreißfigur in den Becher einzusetzen und der Metallstab mit dem Querbügel festzulegen. Nach Überführung der heißen Masse in den Becher kommt dieser sofort in ein geeignetes Kühlgefäß. In das Kühlgefäß tritt von unten Leitungswasser ein, das stetig 3 cm unter dem oberen Becherrand wieder abfließt. Nach einer Stunde wird der Becher aus dem Kühlgefäß herausgenommen und mit Hilfe des Bajonettverschlusses an dem Stativ befestigt. Die Zugkette wird einerseits vorsichtig mit der Öse am Metallstab des Zerreißkörpers, andererseits mit der für die Aufnahme der Zuggewichte bestimmten Schale verbunden. Hierauf werden langsam aber stetig Bleischrote in die Schale gegeben. Der Zeiger bewegt sich hierbei anfangs etwas infolge einer kleinen Dehnung der Zugkette und bleibt dann solange in Ruhe, bis die Zerreißfigur langsam die Gallerte zu zerreißen beginnt. In dem Augenblick, in dem der Zeiger langsam aber gleichmäßig zu steigen anfängt, hört man mit der Zugabe von Schroten auf. In wenigen Sekunden ist dann die Gallerte zerteilt, worauf das Gewicht der erforderlich gewesen Schrotmenge ermittelt wird. Dieses Gewicht bildet einen Ausdruck für die Zerreißfestigkeit des Gelees, d. h. für die Gelierkraft des angewandten Pektinpräparates.

Unerlässlich ist hierbei eine anschließende Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration des Gelees. Zu dem Zwecke löst man 5 g des Gelees in 20 g Wasser unter Erwärmen auf dem Wasserbade und ergänzt die verdampfte Wassermenge nach dem Abkühlen der Lösung. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration in der so erhaltenen Lösung erfolgt am besten nach der elektrometrischen Methode, sie kann aber auch nach MICHAELIS auf colorimetrischem Wege ausgeführt werden. Hierbei soll sich ein  $p_H$ -Wert zwischen 2,95 und 3,05 ergeben. Ist dies nicht der Fall, so muß in einem zweiten Gelierversuch die Wasserstoffionenkonzentration durch Zugabe einer größeren oder kleineren Menge Weinsäure, als oben angegeben wurde, zum Gelieransatz korrigiert werden.

Nur die bei einem  $p_H$  zwischen 2,95 und 3,05 erhaltenen Werte für die Gelierkraft sind für die Beurteilung des Pektinpräparates maßgebend.

<sup>1</sup> Der erforderliche Apparat ist unter der Bezeichnung „Pektinometer nach Prof. LÜERS“ von der Firma F. & M. Lautenschläger, München, Lindwurm-Str. 30/31 zu beziehen.

Beispiel: Wenn das zu prüfende Pektinpräparat 2,64% Calciumpektat liefert, lautet der Ansatz:

$$\frac{0,7 \cdot 100}{2,64} = 26,5.$$

Es waren daher für den Geleensatz anzuwenden:

26,5 g Pektinpräparat + 100 ccm Zuckerlösung ( $D_4^{20} = 1,224$ ), außerdem 0,3 g<sup>1</sup> Weinsäure.

Abzudestillieren sind:  $38 + (26,5 - 15) = 49,5$  ccm Wasser.

Zum Zerreißen der Gallerte erforderliches Schrotgewicht 321 g.

Zerreiβfestigkeit (= Gelierkraft) 321.

$$p_H = 3,05.$$

Die Fehlergrenze dieser Methode beträgt nach MEHLITZ etwa  $\pm 10\%$ .

## B. Untersuchung von Glucosiden, Gummiarten und Schleimstoffen.

Für die eingehendere Untersuchung dieser Stoffe hat A. W. VAN DER HAAR<sup>2</sup> einen ausführlichen Analysengang ausgearbeitet, der, wie folgt, ausgeführt wird:

### 1. Voruntersuchung.

Nach Feststellung von Molekulargewicht, empirischer Formel usw., wenn es sich um chemisch reine Stoffe handelt, bestimmt man zunächst

a) Das Wasser in etwa 0,25 g des Stoffes, und zwar durch Trocknen bei 30–50°, das Adhäsionswasser, bei 105° das Krystallwasser<sup>3</sup> und das noch fester gebundene Wasser bei 150°, wenn das Glucosid diese Temperatur verträgt.

b) Die Asche in üblicher Weise.

Dann prüft man qualitativ auf:

c) Pentosen und Methylpentosen nach S. 855 und bestimmt, wenn diese vorhanden sind:

d) Pentosen und Methylpentosen quantitativ nach S. 928 und 934, wobei gegebenenfalls die Gegenwart von Säuren der Glucuronsäuregruppe zu beachten ist. Man gibt also zweckmäßig zunächst nur die Menge des erhaltenen Furfurols an.

Dann ermittelt man:

e) Die Menge des nach LEFÈVRE (S. 956) abspaltbaren Kohlendioxyds, dessen Menge dem vierfachen Betrage an glucuronsaurem, bzw. galakturonsaurem Lacton entspricht, wenn sie auch nicht unbedingt aus diesen Säuren zu stammen braucht<sup>4</sup>.

f) Nachweis der Glucuronsäuregruppe nach S. 955.

Nach Hydrolyse und Behandlung mit Bariumcarbonat:

g) Nachweis der Hexosen nach S. 846.

h) Bestimmung von Hexosen und Galakturonsäure nach S. 890 und 955.

Zu diesem Zweck wird 1 g Glucosid völlig hydrolysiert<sup>5</sup>, die verwendete Schwefelsäure mit Bariumcarbonat ausgefällt usw. und die Flüssigkeit schließlich steril auf 10 ccm gebracht. Von diesen werden 0,5 ccm im LOHNSTEINschen Apparate (S. 906) vergoren und dadurch die Menge Glucose + Fructose

<sup>1</sup> Der geringe Säuregehalt des Pektinpräparates erforderte hier einen höheren Weinsäurezusatz als gewöhnlich.

<sup>2</sup> A. W. VAN DER HAAR: Anleitung, S. 296–340.

<sup>3</sup> Bei amorphen Stoffen besser bezeichnet als: Konstitutionswasser.

<sup>4</sup> Kastaniensamensaponin enthielt eine andere Säure, die Kohlendioxyd abspaltete.

<sup>5</sup> Vgl. unter Absatz 2.



+ Mannose bestimmt. Mit 1 ccm erhält man im „VAN ITERSON-KLUYVERschen“ Apparate (S. 907) die Menge Glucose + Fructose + Mannose + Galaktose. Die Differenz beider Bestimmungen ergibt die Galaktose. In 5 ccm wird nach der Schleimsäuremethode ebenfalls die Galaktose ermittelt, die mit der durch Gärung gefundenen Menge übereinstimmen muß. Die Galakturonsäure bleibt als Bariumsalz in der Bariumcarbonatmasse.

In weiteren 1 g Substanz wird nach Hydrolyse mit reinem Bariumhydroxyd gegen Kongopapier neutralisiert, wobei die Galakturonsäure in freier Form gelöst bleibt und aus der Erhöhung der Schleimsäureabscheidung abgeleitet werden kann.

#### i) Bestimmung des Nicht-Saccharidrestes (des Aglucons).

Bei der Hydrolyse der Glucoside entsteht immer ein Nicht-Saccharidrest, so bei Saponinen das in Wasser unlösliche oder schwerlösliche Sapogenin, bei Arbutin ein mit Äther ausschüttelbarer Stoff. Auch das Auftreten eines flüchtigen Produktes kann in Frage kommen. Die Prüfung auf diese Stoffe ist dem besonderen Falle anzupassen. Die Summe aller ermittelten Stoffe soll etwas über 100% (Aufnahme von Wasser bei der Hydrolyse) betragen.

M. B. JACOBS und L. JAFFE<sup>1</sup> geben eine Übersichtstafel über das Verhalten der gebräuchlichen Gummiarten gegen Reagentien wie MILLONS Reagens, Bleiacetat, Bleiessig, Kalilauge, Eisenchlorid, Alkohol, Borax, SCHIFFS Reagens, SCHWEITZERS Reagens, Jodlösung, Gerbsäure und Schwefelsäure an, die zur Erkennung und Kennzeichnung eines Gummis dienen kann.

## 2. Hydrolyse.

a) Ausführung der Hydrolyse. Es hängt von der Natur des zu prüfenden Stoffes ab, ob die Hydrolyse in 1-, 2- oder 5%iger Schwefelsäure in Wasser oder in 45%igem Alkohol auszuführen ist, um die letzten Spuren reduzierender Substanz abzuspalten. Es empfiehlt sich, die Hydrolyse zunächst mit 2- oder 5%iger Schwefelsäure möglichst weit durchzuführen und dann erst alkoholische Schwefelsäure zu versuchen.

Bei Kastaniensaponin mußte je 6 Stunden zuerst mit 5%iger wäßriger, dann mit 5%iger alkoholischer (45%iger Alkohol), schließlich mit 5%iger stärker alkoholischer (70%iger Alkohol) Schwefelsäure gekocht, bei Euxanthinsäure bei 130—150° mit 1—2%iger Schwefelsäure im Autoklaven gedämpft werden. Bei Gummiarten verläuft die Hydrolyse schneller, so bei Aprikosenbaumgummi mit 5%iger Schwefelsäure bei 6stündigem Kochen, bei Tragantgummi nach 2stündigem Erhitzen im Wasserbade mit 6%iger Schwefelsäure unter nachfolgendem 6—7stündigem Kochen am Rückflußkühler. Bei Vorliegen von Säuren der Glucuronsäuregruppe empfiehlt es sich, die Kochung mit der verdünnten Schwefelsäure in der S. 956 beschriebenen Vorrichtung vorzunehmen, um das bei der Lösung gegebenenfalls abgespaltene Kohlendioxyd messen zu können. Nach Ermittlung von Art und Dauer der Hydrolyse wird eine größere Substanzmenge hydrolysiert, etwa vorhandener Alkohol durch Abdampfen entfernt und die Flüssigkeit nach 24 Stunden vom ausgeschiedenen Sapogenin abfiltriert. Ein gegebenenfalls vorhandener löslicher Nichtsaccharidrest wird durch Ausschütteln mit Äther entfernt usw. Die Hydrolysenflüssigkeit wird nun entweder mit Bariumcarbonat oder mit Bariumhydroxyd behandelt.

b) Bariumcarbonat-Verfahren. Die Flüssigkeit wird mit einem geringen Überschuß an reinem Bariumcarbonat zur Trockne verdampft. Die erhaltene Masse wird dann wiederholt mit 90%igem Alkohol ausgekocht und scharf abgesogen. Die Lösung, die die Saccharide und nur sehr wenig Säuren als Bariumsalze, die im Niederschlag zurückbleiben, enthält, wird zur Sirupdicke eingedampft, der Sirup wieder mit 95%igem Alkohol gekocht, filtriert, mit reiner Tierkohle entfärbt und nach Filtration und Eindampfen wieder als dicker, meist hellgelber oder farbloser Sirup erhalten, der praktisch nur die Saccharide enthält. Diesen Sirup kann man dann nach d) weiter untersuchen.

<sup>1</sup> M. B. JACOBS u. L. JAFFE: Ind. Engin. chem., Analyt. Edition 1931, 3, 210.

Der zurückgehaltenen und getrockneten Bariumcarbonatmasse werden die Bariumsalze der Säuren mittels Wasser entzogen. Die Lösung wird mit Schwefelsäure unter Vermeidung eines Überschusses zersetzt, die Flüssigkeit im Vakuum zum Sirup eingedampft, dieser mit 95%igem, dann 90%igem Alkohol ausgekocht, mit Tierkohle entfärbt und nach Filtration wieder eingedampft. In diesem Sirup prüft man dann anschließend auf organische Säuren, besonders die der Glucuronsäuregruppe nach S. 955.

c) Bariumhydroxyd-Verfahren. Bei dieser Methode wird zu der Hydrolysenflüssigkeit solange heiße wäßrige Barytlösung zugesetzt, bis Kongopapier eben nicht mehr gebläut wird, dann wird mit Schwefelsäure bzw. Barytlösung genau auf den Punkt eingestellt, bei dem die Lösung noch Spuren von Bariumsalz aufweist. Die Lösung enthält die Säuren und Saccharide, aber nicht getrennt wie bei dem Bariumcarbonat-Verfahren.

d) Besondere Vorbereitung der Sirupe für die Krystallisationen. Um gute Krystallisationen zu erhalten, empfiehlt sich eine möglichst weitgehende Reinigung und Entfärbung der Sirupe. Die bei Polysacchariden wie bei Gummiarten und Pflanzenschleimen oft entstehenden „gummösen Substanzen“ entfernt man durch Ausfällung mit starkem Alkohol, wobei die Saccharide in der Regel<sup>1</sup> in Lösung bleiben. WITSOE<sup>2</sup> reinigt den Sirup durch Schütteln kleinerer Mengen mit dem fünffachen Volumen einer Aceton-Alkohol (95%)-Mischung (1:2). Auch Alkohol und Äther sind verwendbar. Stets empfiehlt es sich, nur kleine Mengen der Sirupe zu verarbeiten und allmählich unter öfterer Wiederholung der Behandlung vorzugehen, um nicht zu viel Saccharide zu verlieren. Die Krystallisation kann oft sehr langsam einsetzen. Ein Impfen von kleinen Tröpfchen mit verschiedenen Sacchariden zur Einleitung der Krystallisation und Verfolgung des Vorganges unter dem Mikroskop ist nach UHLANDER<sup>3</sup> zu empfehlen. Bisweilen krystallisiert aber dabei statt des Saccharids, mit dem geimpft wurde, ein anderes aus<sup>4</sup>. — Von großem Werte dürfte hier auch die vorherige Trennung der Zucker von den Begleitstoffen mittels Bariumhydroxyd in Methylalkohol nach ROTHENFUSSER (vgl. S. 844) sein.

e) Beispiel der Zusammensetzung von Glucosiden und Schleimstoffen. Als Beispiele für die Ergebnisse des beschriebenen Untersuchungsganges seien nebenstehende von VAN DER HAAR ermittelten Analysenbilder genannt.

Tabelle 23.

| Zusammensetzung     | Aprikosen-<br>baumgummi<br>% | Traganth-<br>gummi<br>%   | Kastanien-<br>saponin<br>%   |
|---------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Wasser . . . . .    | 16,6                         | 2,0                       | 9,8                          |
| Asche . . . . .     | 2,4                          | 2,6                       | 1,0                          |
| Galakturonsäure     | etwa 8,8                     | 32,8                      | etwa 10,0 <sup>5</sup>       |
| Pentosen . . . . .  | 42,9                         | 29,5                      | 8,97                         |
|                     | (Arabinose)                  | (Arabinose<br>und Xylose) | (als Arabinose<br>berechnet) |
| Methylpentosen      | 5,0                          | 18,7                      | 4,23                         |
|                     |                              | (Fucose)                  | (als Rhamnose<br>berechnet)  |
| Galaktose . . . . . | 28,0                         | 3,8                       | 2,24                         |
| Glucose . . . . .   | 0,0                          | 2,2                       | 23,0                         |
| Nicht Saccharid     | 0,78                         | 1,1                       | 26,2                         |
|                     |                              |                           | (Roh-Sapo-<br>genin)         |
| Flüchtige Säure .   | —                            | —                         | 3,4                          |
| Summe               | etwa 104,48                  | etwa 110,45               | etwa 108,84                  |

Über das Vorkommen von Glucuronsäure bzw. Galakturonsäure, nachgewiesen durch Fällung mit basischem Bleiacetat und nach der Naphthoresorcinreaktion (S. 955),

<sup>1</sup> Man prüfe zur Kontrolle der Niederschläge und wiederhole nötigenfalls die Fällungen.

<sup>2</sup> J. A. WITSOE: Über Arabinose, Xylose und Fucose aus Traganth. Dissertation Göttingen 1899.

<sup>3</sup> UHLANDER: Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. Dissertation Göttingen 1905.

<sup>4</sup> Bezüglich seltener vorkommender Zuckerarten sei auf das Buch von VAN DER HAAR verwiesen.

<sup>5</sup> Säuren als Glucuronsäuren berechnet, aber Säuren anderer Art.

in verschiedenen Gummiarten und Saponinen vgl. VAN DER HAAR<sup>1</sup>. Er erhielt eine positive Reaktion (Band auf D)

bei Gummi arabicum, Kirsch-, Aprikosen-, Pflaumengummi, Traganth (schwach), Schleim von Fucus vesiculosus, Isländischem Moos (schwach), Carrageen, Medicago-Saponin (im Methylalkohol unlöslichen Teil, nicht im löslichen Teil), Aralia-Saponin, eine negative

bei Kastanien-, Saponaria-Saponin, Phlorrhizin, Convallamarin, Convallarin, Cyklamin, Hederin, Sarsaparillus-, Sennega-Saponin, Osonin, Digitonin und Agar Agar.

C. GRIEBEL und P. CASAL<sup>2</sup> ermittelten für den Kakaoschalenschleim, berechnet auf die aschefreie Trockenmasse (Wasser 13,67%, Asche 13,27%):

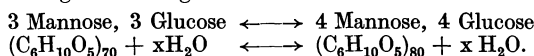
|           |               |           |                              |
|-----------|---------------|-----------|------------------------------|
| Arabinose | Methylpentose | Galaktose | Galakturonsäure (als Lacton) |
| 14        | 7             | 32        | 47%                          |

Über die Zusammensetzung von Pektinstoffen vgl. S. 948.

Das Hefengummi soll nach MIGEN und SPRENG bei der Hydrolyse doppelt so viel Mannose wie Glucose, aber keine Galaktose und keine Pentosen liefern. Die spezifische Drehung geben sie zu

$$[\alpha]_D^{20} = 89,2-89,6^{\circ}$$

an. H. EULER und A. FODOR<sup>3</sup> haben zur Nachprüfung dieser Angaben Hefengummi durch Auskochen von Hefe mit Wasser nach NÄGELI und LOEW dargestellt und das Erzeugnis nach SALKOWSKI gereinigt. Auf Grund ihrer Ergebnisse geben sie folgende Grenzen für die Zusammensetzung des Hefengummis an:



## C. Nachweis und Bestimmung von Mannit, Sorbit, Dulcitol und Inositol.

Obwohl Mannit und Sorbit keine Kohlenhydrate, sondern sechswertige durch Reduktion von Mannose bzw. Glucose oder Sorbose entstanden zu denkende Alkohole sind, zeigen sich doch einige gemeinsame äußeren Eigenschaften damit. Das gleiche gilt von Dulcitol, der durch Reduktion aus Galaktose erhalten werden kann.

Von diesen kommt in Lebensmitteln Mannit als Produkt der sog. „schleimigen Gärung“, z. B. bisweilen in Wein vor. Der Sorbit, zuerst aus dem Saft der Vogelbeeren erhalten, ist heute für den Nachweis von Obstwein in Traubenwein nach WERDER<sup>4</sup> von großer Bedeutung geworden. M. FISCHLER<sup>5</sup> erhielt aus Birnenweinen etwa 7—10, aus Apfelweinen 2—7 g Benzalsorbit, entsprechend etwa 4—5 bzw. 1—4 g Sorbit je l. Dulcitol scheint in vielen Pflanzensäften vorzukommen.

Der Inositol, von der gleichen Zusammensetzung wie die Kohlenhydrate und der Formel  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , ist als cyclische Verbindung nämlich als Hexahydroxybenzol  $\text{C}_6\text{H}_6(\text{OH})_6$  anzusehen. Dem Inositol scheint der Quercitol im Saft der Eicheln  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  nahe zu stehen.

Allgemeine Eigenschaften der genannten Stoffe sind

|                   | Mannit   | Sorbit  | Dulcitol | Inositol | Quercitol <sup>6</sup> |
|-------------------|----------|---------|----------|----------|------------------------|
| Schmelzpunkt      | 167—168° | 110—111 | 188°     | 225      | 222°                   |
| $[\alpha]_D^{20}$ | — 0,03°  | — 1,73° | inakt.   | inakt.   | + 24,3°                |

Mannit, Sorbit und Dulcitol verhalten sich analytisch ähnlich. Die im folgenden für Mannit angegebenen Nachweisverfahren ermöglichen keine

<sup>1</sup> VAN DER HAAR: Biochem. Zeitschr. 1918, 88, 205; C. 1918, II, 475.

<sup>2</sup> C. GRIEBEL u. P. CASAL: Z. 1929, 58, 482.

<sup>3</sup> H. EULER u. A. FODOR: Zeitschr. physiol. Chem. 1911, 72, 339; Z. 1913, 26, 253.

<sup>4</sup> Vgl. J. WERDER u. TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1928, 19, 344; C. 1929, I, 586.

<sup>5</sup> M. FISCHLER: Wein und Rebe 1931, 13, 107.

<sup>6</sup> Nach anderen Angaben schwitzt Quercitol bei 235°.

Unterscheidung von den genannten Isomeren. Der Sorbit kann aber nach dem Verfahren von WERDER erkannt werden, während sich der Dulcit durch Oxydation mit Salpetersäure in Schleimsäure (vgl. S. 854) überführen läßt.

### 1. Nachweis und Bestimmung von Mannit.

Zum Nachweise des Mannits kann man sich seiner Krystallisierbarkeit (Schmp. 167—168°) und seines Einflusses auf den Säuregrad von Borsäure bedienen.

#### a) Mannitnachweis durch Krystallisation.

Nach U. GAYON und E. DUBOURG<sup>1</sup> läßt man einige Kubikzentimeter von mannithaltigem Wein auf einem Uhrglase bei niederer Temperatur langsam verdunsten. Der Mannit krystallisiert innerhalb 24 Stunden in Gestalt sehr feiner, seidenartiger, nicht zu verkennender Nadeln aus; Weine, die 0,1 g Mannit in 100 ccm enthalten, zeigen diese Erscheinung noch.

E. FEDER<sup>2</sup> erhielt aus Sauerkraut durch Trocknen und Auskochen mit 90%igem Alkohol beim Erkalten der Lösung Krystalle, die er durch Umkrystallisieren unter Zusatz von Tierkohle reinigte, worauf sie den Schmelzpunkt 166,5° zeigten. Ihre (2%ige) Lösung in Wasser war optisch inaktiv, drehte aber nach Zusatz von 5% Borax stark rechts. 2 g der Krystalle wurden mit 10 g Essigsäureanhydrid 6 Stunden am Rückflußkühler erhitzt und das Produkt aus Alkohol umkrystallisiert, worauf der Schmelzpunkt des Acetates 118,5° und die Verseifungszahl 771 (berechnet 773) betrug.

B. TOLLENS<sup>3</sup> gewann aus Spargelsaft Mannit durch Eindunsten zum Sirup und Krystallisierenlassen. Die nach zweimaligem Umkrystallisieren mit Blutkohle erhaltenen reinen Nadeln schmolzen bei 167—168°, waren optisch fast inaktiv und schmeckten schwach süßlich. — TOLLENS ist der Ansicht, daß der Mannit ursprünglich nicht in dem Spargel vorhanden war, sondern beim Stehen des Saftes entstanden ist.

#### b) Mannitnachweis durch Beeinflussung des Säuregrades von Borsäure.

Die an sich außerordentlich schwache Borsäure geht mit Mannit in die mittelstarke Mannitborsäure über, was mit geeigneten Indicatoren erkannt werden kann. Glycerin verhält sich ähnlich, wirkt aber schwächer und kann durch Alkohol-Äther beseitigt werden. Zur Ausführung der Reaktion verwendet J. A. ROSE<sup>4</sup> mit Borsäure getränktes blaues Lackmuspapier, das dadurch bereitet wird, daß man das Papier mit kalt gesättigter, auf das Zehnfache verdünnter Borsäurelösung, mit einer Spur Salzsäure und Calciumcarbonat im Überschuß versetzt, sowie filtriert, trinkt und trocknet. — Bringt man auf dieses Papier einen Tropfen Mannit- (oder Glycerin-)lösung, so entsteht ein roter Flecken. H. ALBER<sup>5</sup> fand, daß die Reaktion auf Mannit etwa 20mal so empfindlich verlief wie auf Glycerin. Die Erfassungsgrenze bei ersterem lag bei 0,0006 mg bei letzterem bei 0,0030 mg.

Nach eigenen vorläufigen Versuchen in Gemeinschaft mit H. GOLTERMANN<sup>6</sup> lassen sich noch kleine Mengen Mannit an der  $p_{H}$ -Abnahme einer 2%igen Borsäurelösung erkennen, wenn man Mannitlösung und Borsäurelösung mit einigen Tropfen Methylrotlösung versetzt und mit 0,01 N.-Natronlauge auf die Zwischenfarbe Orangegelb ( $p_{H}$  = etwa 5,5) einstellt. Gießt man nun beide Lösungen zusammen, so tritt bei Gegenwart von Mannit eine deutliche Rotfärbung ein. Dulcit verhält sich hierbei wie Mannit; Sorbit wirkt etwa

<sup>1</sup> U. GAYON u. E. DUBOURG: Ann. Inst. Pasteur 1894, 8, 109. Nach K. WINDISCH: Die chemische Untersuchung und Beurteilung des Weines. Berlin 1896, S. 222.

<sup>2</sup> E. FEDER: Z. 1911, 22, 295.

<sup>3</sup> B. TOLLENS: Journ. Landw. 1911, 59, 429; Z. 1915, 24, 454.

<sup>4</sup> J. A. ROSE: Beiträge zur Kenntnis der Borsäure. Dissertation Erlangen 1902. — Nach H. ALBER: vgl. folgende Anm.

<sup>5</sup> H. ALBER: Mikrochemie 1929, 7, 28.

<sup>6</sup> J. GROSSFELD u. H. GOLTERMANN: Privatmitteilung.

doppelt so stark. Glycerin ist vorher durch Alkohol zu entfernen. Seine Wirkung beträgt aber, wie auch wir bestätigt fanden, nur etwa  $\frac{1}{20}$  der des Mannits oder etwa  $\frac{1}{40}$  der des Sorbits. — Pufferstoffe (Phosphate) beeinträchtigen natürlich die Empfindlichkeit der Reaktion und sind vorher auf geeignete Weise zu entfernen.

### c) Bestimmung des Mannits.

α) Durch Krystallisation bzw. Abscheidung mit Alkohol. Nach SÉGOU<sup>1</sup> verfährt man folgendermaßen: 250 ccm des zu prüfenden Weines werden längere Zeit gekocht und dann mit einer verdünnten Lösung von Kaliumcarbonat versetzt, bis die Flüssigkeit eine grünliche Farbe angenommen hat. Man fügt 20 g Tierkohle hinzu, kocht die Mischung und setzt Bleiessig und dann Wasser zu, bis das ursprüngliche Volumen des Weines erreicht ist. Man filtriert die Flüssigkeit von dem Bleiniederschlag ab, leitet in das Filtrat zur Abscheidung des Bleies Schwefelwasserstoff und filtriert die Flüssigkeit von dem Schwefelbleiniederschlag ab. Das Filtrat dampft man auf dem Wasserbade zur dickflüssigen Beschaffenheit ein und läßt den Rückstand in der Kälte stehen. Vorhandener Mannit krystallisiert alsbald in charakteristischen, spießigen Krystallen aus; man trocknet sie zwischen Filtrierpapier ab, wäscht sie auf einem gewogenen Filter mit einigen Kubikzentimetern einer gesättigten Lösung von Mannit in Alkohol von 75 Maßprozent, trocknet Filter und Krystalle bei 100° und wägt sie. — Enthält der Wein erhebliche Mengen Invertzucker, so entfernt man diesen vor der Bestimmung des Mannites durch Vergären.

P. CARLES<sup>2</sup> verdampft 100 ccm oder mehr Wein bis zur dickflüssigen Beschaffenheit und läßt den Rückstand an einem kühlen Orte stehen. Nach 24 Stunden ist der Mannit auskrystallisiert und bildet getrennte Krystallgruppen. Man wäscht die Krystalle zur Entfernung der übrigen Extraktstoffe mit kaltem Alkohol von 85 Maßprozent, mischt den Rückstand mit Tierkohle und zieht ihn mit heißem Alkohol von 85 Maßprozent aus. Beim Verdampfen der alkoholischen Lösung hinterbleibt krystallisierter Mannit, den man trocknet und wägt. — Die Abscheidung des Mannits durch Krystallisation eignet sich im allgemeinen nur für größere Mannitmengen.

Tabelle 24.

| Verbrauch an<br>0,1 N.-Thio-<br>sulfatlösung<br>für 25 ccm<br>Mischung<br>ccm | Mannit in<br>100 ccm<br>Mischung<br>mg | Verbrauch an<br>0,1 N.-Thio-<br>sulfatlösung<br>für 25 ccm<br>Mischung<br>ccm | Mannit in<br>100 ccm<br>Mischung<br>mg | Verbrauch an<br>0,1 N.-Thio-<br>sulfatlösung<br>für 25 ccm<br>Mischung<br>ccm | Mannit in<br>100 ccm<br>Mischung<br>mg |
|---|--|---|--|---|--|
| 0,25  | 0,0                                    | 9,00  | 310,7                                  | 21,00   | 691,9                                  |
| 0,50  | 8,3                                    | 10,00   | 344,4                                  | 22,00   | 724,1                                  |
| 1,00  | 27,4                                   | 11,00   | 378,1                                  | 23,00   | 756,6                                  |
| 1,50  | 47,8                                   | 12,00   | 410,8                                  | 24,00   | 789,6                                  |
| 2,00  | 68,0                                   | 13,00   | 441,6                                  | 25,00   | 822,6                                  |
| 2,50  | 88,0                                   | 14,00   | 472,4                                  | 26,00   | 855,6                                  |
| 3,00  | 107,1                                  | 15,00   | 503,1                                  | 27,00   | 888,6                                  |
| 4,00  | 142,8                                  | 16,00   | 534,4                                  | 28,00   | 930,9                                  |
| 5,00  | 176,7                                  | 17,00   | 565,6                                  | 29,00   | 992,4                                  |
| 6,00  | 210,0                                  | 18,00   | 596,9                                  | 29,10   | 1000,0                                 |
| 7,00  | 243,3                                  | 19,00   | 628,1                                  |   |  |
| 8,00  | 277,0                                  | 20,00   | 659,7                                  |   |  |

<sup>1</sup> SÉGOU: Journ. Pharm. et Chim. [5], 1893, 28, 103. — Nach K. WINDISCH: Die chemische Untersuchung und Beurteilung des Weines.

<sup>2</sup> P. CARLES: Compt. rend. Paris 1891, 112, 811. — Nach K. WINDISCH: vgl. vorige Anm.

$\beta$ ) Mit Kupferlösung und Natronlauge. Ähnlich wie bei der Glycerinbestimmung nach M. WAGENAAR<sup>1</sup> füllt J. SMIT<sup>2</sup> die zu untersuchende Flüssigkeit in einen 100 ccm-Meßzylinder bis zu 50 ccm auf, versetzt mit genau 25 ccm 4 N.-Natronlauge und 25 ccm Kupfersulfatlösung (125 g des Salzes im Liter), schüttelt kurz (höchstens 2 Sekunden) und läßt 12 Stunden absetzen. Hierbei hält 1 Mol Mannit 2 Mol. Kupferhydroxyd in Lösung. — Dann werden 25 ccm klare Flüssigkeit herauspipettiert, Kaliumjodid zugegeben und das Kupfer jodometrisch mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung bestimmt. Zur Umrechnung des Titrationsergebnisses auf die vorhandene Mannitmenge dient Tabelle 24 auf voriger Seite.

Störend bei der Bestimmung wirken aber folgende Stoffe, die durch geeignete Behandlung zu beseitigen sind.

Tabelle 25.

| Verbindungen                 | Zu beseitigen durch  |
|------------------------------|--|
| Ammoniumverbindungen . . .   | Kochen mit Natronlauge   |
| Diaminosäuren . . . . .      | Fällen mit Phosphorwolframsäure, Überführen in Oxy-<br>säuren und anschließend Ausziehen mit Äther.  |
| Zuckerarten . . . . .        | Vergären, Erhitzen mit Alkalien oder Kalk S. 884), an-<br>schließende Klärung mit Bleiessig, Beseitigung der ent-<br>stehenden Milchsäure durch Perforieren mit Äther. |
| Glycerin . . . . .           | Trennung mit Alkohol und Äther wie bei der Weinanalyse.  |
| Oxysäuren (Weinsäure usw.) . | Fällung als Calcium- oder Bleisalz.  |

Andere Hexite, wie Sorbit und Dulcit, verhalten sich ähnlich wie Mannit und machen die Mannitbestimmung auf diese Weise unbrauchbar.

$\gamma$ ) Durch Polarisation. Das an sich geringe Drehungsvermögen des Mannits wird durch Zusätze der Salze von Borsäure, Arseniger Säure und Antimoniger Säure dem Vorzeichen nach umgekehrt und stark erhöht. Diese Wirkung von Borax wurde zuerst von MÜLLER<sup>3</sup> zur Bestimmung des Mannits verwendet. Die Drehungserhöhung durch Borax ist aber verhältnismäßig klein, von der Temperatur ziemlich stark abhängig und nicht durch eine geradlinige Beziehung ausdrückbar. Außerdem zeigen außer Dulcit und Sorbit auch viele andere Stoffe wie alle Zuckerarten, Tartrate, Malate und Dextrin ein ähnliches Verhalten. Verbindungen mit einer Alkoholgruppe wirken dadurch mehr oder weniger störend, daß sie Borsäure binden und deren Konzentration verändern.

Nach J. BADREAU<sup>4</sup> ist für diese Bestimmung Arsenit besser geeignet. Wenn nämlich auf 1 Teil Mannit mindestens 17,5 Teile Arsentrioxyd als Alkaliarsenit vorhanden sind, ist die optische Ablenkung der Menge des Mannits proportional und beträgt zwischen 16 und  $21^{\circ} + 46,88^{\circ}$ . Zur Bestimmung ermittelt man die Drehung einer filtrierten Mischung von 20 ccm Mannitlösung mit nicht mehr als 0,339 g Mannit und 30 ccm einer Lösung von 198 g Arsentrioxyd, 132,5 g Natriumcarbonat in einem Rohre von der Länge 1 dm und berechnet nach der Formel

$$46,88^{\circ} = \frac{\alpha \cdot 50}{1 \cdot x} \text{ oder } x = 1,066 \alpha.$$

Alkohol, der das Drehungsvermögen erhöht, ist vorher durch Abdampfen zu entfernen. Glycerin erniedrigt die Drehung, aber nur in zu vernachlässigendem Grade, wenn die angewendete Menge Arsenige Säure die Glycerinmenge übersteigt. Aldosen, Ketosen, Polysaccharide, deren Drehungsvermögen durch Arsenige Säure nicht beeinflusst wird, stören nicht, wenn man die Drehung vor und nach dem Zusatz der Arsenigen Säure bestimmt. Weinsäure und Apfelsäure sind durch Bleiacetat zu entfernen. Bei Anwesenheit von Inosit oder Quercit ist das Verfahren nicht anwendbar. — BADREAU fand so in Manna 52,25%, in Champignons 1,81—3,0% Mannit.

## 2. Nachweis und Bestimmung von Sorbit.

### a) Nachweis von Sorbit nach J. WERDER<sup>6</sup>.

Die zunächst zur Prüfung von Wein und weinähnlichen Getränken ausgearbeitete Arbeitsvorschrift, beruhend auf Abscheidung des Sorbits als

<sup>1</sup> M. WAGENAAR: Pharm. Weekbl. 1911, 48, 497; Z. 1912, 24, 586.

<sup>2</sup> J. SMIT: Zeitschr. analyt. Chem. 1914, 53, 473; Z. 1915, 30, 104. Vgl. Chem. Weekbl. 1913, 10, 894.

<sup>3</sup> Vgl. BEILSTEIN, 4. Aufl., Bd. 1, S. 538.

<sup>4</sup> J. BADREAU: Journ. Pharm. et Chim. [7], 1921, 24, 12; C. 1921, IV, 894.

<sup>5</sup> J. BADREAU gibt  $46^{\circ}, 53'$  an.

<sup>6</sup> J. WERDER: Z. 1929, 58, 123 u. Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1929, 20, 7.

(Mono- und) Dibenzalsorbit, ist bei sinngemäßer Abänderung auch bei anderen Lebensmitteln anwendbar. Man verfährt nach der vom Reichsausschuß für Weinforschung bekannt gegebenen Vorschrift<sup>1</sup> wie folgt:

α) Abscheidung des Benzalsorbites nach WERDER.

Vorbemerkung. Jede Untersuchung muß zum mindesten zweimal ausgeführt werden. Dabei sind jedesmal 100 ccm Wein (nicht mehr oder weniger!) zu verwenden. Die Wiederholungen darf man erst dann ansetzen, wenn man gemäß der Fußnote 7 aus der beim ersten Versuch gewonnenen Menge Benzalsorbit beurteilen kann, ob für den nächsten Versuch der Benzaldehydzusatz erhöht oder erniedrigt werden muß.

Arbeitsvorschrift. Man bringt 100 ccm Wein<sup>2,3</sup> in einen 300 ccm fassenden Kolben, gibt 5 g (bei Rotweinen bis zu 7 g) Tierkohle (*Carbo animalis pro analysi Merck*<sup>4</sup>) hinzu, erhitzt zum Sieden und erhält 2 Minuten im gelinden Sieden. Die siedend heiße Flüssigkeit wird mit Hilfe einer Nutsche von etwa 8 cm Durchmesser durch ein doppeltes Papierfilter scharf abgesogen und die Kohle einigemal mit wenig heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat, das völlig blank und farblos sein muß<sup>5</sup>, wird in einen 250 ccm fassenden Jenaer Fraktionierkolben mit kurzem, aber weitem Hals (lichte Weite 25 mm) gebracht<sup>6</sup>. Sodann wird die Flüssigkeit unter Verwendung einer bis auf den Boden des Kolbens reichenden Capillare unter stark vermindertem Druck eingengt. Dabei soll der Kolben bis zum Hals in ein Wasserbad eintauchen, dessen Temperatur 70° auf keinen Fall überschreiten darf. Besonderer Aufmerksamkeit bedarf der Endpunkt der Destillation: Der Rückstand darf nicht dünnflüssig sein; er muß vielmehr so dickflüssig sein, daß er sich mit den später zuzufügenden Reagenzien gerade noch mischen läßt.

Den Rückstand mischt man gründlich mit 4 Tropfen = 0,1 ccm Benzaldehyd<sup>7,8</sup> und 1 ccm Schwefelsäure (hergestellt durch Mischen gleicher Raumteile Wasser und Schwefelsäure von der Dichte 1,84), indem man das Ganze

<sup>1</sup> Vgl. Reichsgesundheitsblatt 1933, 8, 634.

<sup>2</sup> Mehr als 3 g/l Zucker enthaltende Weine müssen vorher vom Zucker befreit werden: 100 (oder gemäß Fußnote 3 130) ccm Wein werden in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad bis zur Hälfte eingedampft, dann spült man den Rückstand mit etwa 50 ccm Wasser in einen 300 ccm-Kolben, impft nach dem Abkühlen mit einer Spur Reihefe und läßt bei 20° vergären. Nach beendeter Gärung versetzt man ohne Rücksicht auf die Hefe mit Tierkohle und verfährt weiter wie oben. Ist man von 130 ccm Wein ausgegangen, so ist nach beendeter Gärung zunächst auf 130 ccm aufzufüllen.

<sup>3</sup> Statt dessen kann man auch 130 ccm Wein mit 6–8 g Kohle erhitzen, wobei man das Entweichen von Dämpfen durch Aufsetzen einer Kühlbirne auf die Kolbenmündung verhindert. Man filtert durch ein Faltenfilter (14,5 cm Durchmesser), das man ebenfalls bedeckt hält. Von dem erkalteten Filtrat werden 100 ccm (entsprechend 100 ccm Wein) endgültig verarbeitet.

<sup>4</sup> Die Kohle beseitigt auch etwa vorhandenes Dulcin, das nach G. REIF (*Z.* 1933, 66, 408) mit Benzaldehyd nach obiger Vorschrift mitabgeschieden wird und dann sowohl eine krystallinische Acetylverbindung als auch mit Aceton (*S.* 969) eine gelbrote Färbung liefert.

<sup>5</sup> Durchgelaufene, selbst dem Auge unsichtbare Kohle oder Hefeteilchen stören nach H. KRÄPPE (*Deutsch. Essigind.* 1933, 37, 397; *Z.* 1934, 67, 426) besonders bei der Farb-reaktion nach REIF (vgl. *S.* 969). — Durchsaugen durch Klärschicht Nr. 5 der Leitz-Werke in Kreuznach beseitigte diese Schwierigkeiten.

<sup>6</sup> Auch Kolben mit Einheitsschliff nach *Zeitschr. analyt. Chem.* 1929, 77, 443 können verwendet werden.

<sup>7</sup> Mitunter genügen 4 Tropfen Benzaldehyd nicht; so bei Anwesenheit von viel Sorbit oder viel Mannit. Die Fällung kann dann erst nach Zugabe von mehr Benzaldehyd vollständig werden. In solchen Fällen wird der erste Versuch mit 4, der zweite mit 6, der dritte mit 8 Tropfen Benzaldehyd durchgeführt, bis man eine Höchstaubeute von Benzalverbindungen erhält. Da aber andererseits geringe Mengen Benzalsorbit in Benzaldehyd löslich sind, muß man, falls man beim ersten Versuch überhaupt keinen Niederschlag erhalten hat, beim zweiten Versuch nur 2 Tropfen Benzaldehyd zugeben.

<sup>8</sup> Der Benzaldehyd muß im Dunkeln, am besten in kleinen zugeschmolzenen Röhrchen aufbewahrt werden. Nötigenfalls ist er durch Destillation zu reinigen. *Kp.* 760: 179° (korr.) (vgl. dazu VOGT, *S.* 971).

mit einem passend gebogenen Glasstab verreibt<sup>1</sup>. Innerhalb der nächsten halben Stunde muß das Mischen oder Umschwenken mehrere Male gründlich wiederholt werden. Sodann wird der Kolben verschlossen und mindestens 12 Stunden im Eisschrank bei einer Temperatur von 4—5° aufbewahrt. Schließlich gibt man in den Kolben 100 ccm destilliertes Wasser und läßt unter zeitweiligem Umschwenken stehen, bis sich alles völlig gelöst hat oder bis sich ein Niederschlag abgesetzt hat<sup>2</sup>. Bei geringen Niederschlagsmengen kann dies einige Stunden dauern.

Den Niederschlag sammelt man mit Hilfe der Saugpumpe in einem bei 95° getrockneten und nach dem Abkühlen gewogenen Jenaer Glasfrittetiegel (Körnung 3), wäscht mit kaltem Wasser bis zur völligen Entfernung der Schwefelsäure, trocknet 1 Stunde bei 95° und wägt. Dann übergießt man den Niederschlag wiederholt mit wenig heißem Aceton, bis der Benzalsorbit völlig gelöst ist. Die Lösung sammelt man in einem Absaugeröhrchen (oder Einheitsschlifföhrchen) von 30 mm Weite und 180 mm Höhe. Der Frittetiegel wird wieder bei 95° getrocknet und zurückgewogen. Das Gewicht des Gesamtniederschlags des gelösten Benzalsorbit und der Verunreinigungen ergibt sich durch Subtraktion der verschiedenen festgestellten Gewichte.

β) Acetylierung des erhaltenen Niederschlags nach C. ZÄCH<sup>3</sup>.

Vorbemerkung. Man acetyliert entweder die Gesamtmenge der erhaltenen Benzalverbindung oder mindestens 30 mg davon. Im letzteren Falle führt man die Lösung der Benzalverbindung aus dem Röhrchen in einen geeichten Meßkolben über, füllt mit Aceton bis zur Marke auf, mischt und bringt einen entsprechenden Anteil der Lösung in das Röhrchen zurück.

Arbeitsvorschrift. Die in dem Röhrchen befindliche Acetonlösung wird in ein schwach erwärmtes Wasserbad gestellt und unter Absaugen der Dämpfe zur Trockne gebracht. Den Rückstand erhitzt man mit 3 ccm N.-Salzsäure eine halbe Stunde im siedenden Wasserbad; dabei geht der Niederschlag allmählich in Lösung. Schließlich ersetzt man die etwa verdampfte Flüssigkeit durch Wasser, gibt nötigenfalls eine Spur Tierkohle hinzu, mischt vorsichtig, erwärmt einige Minuten im Wasserbad, filtert durch ein kleines Filter in ein Reagensglas und wäscht mit wenig heißem Wasser aus, bis das Gesamtfiltrat etwa 10 ccm beträgt. Nach völligem Abkühlen schüttelt man das Filtrat mit 2 ccm Äther aus, saugt den Äther mit einer Capillare ab, wiederholt das Ausäthern und befreit schließlich die wäßrige Lösung durch Einstellen in ein Wasserbad von den Ätherresten.

Die wäßrige Lösung wird in das gereinigte Absaugeröhrchen (Schlifföhrchen) zurückgebracht und in der vorher beschriebenen Weise im luftverdünnten Raum zur Trockne verdampft<sup>4</sup>. Zu dem Rückstand gibt man etwa 2 ccm Wasser, verdampft wiederum und wiederholt das Verfahren, bis bei der Prüfung mit Kongopapier Salzsäure nicht mehr nachweisbar ist.

Der Rückstand wird mit 0,5 ccm Essigsäureanhydrid<sup>5</sup> und einem Tropfen Pyridin<sup>5</sup> versetzt. Dann verschließt man das Ansatzrohr des Absaugeröhrchens

<sup>1</sup> Statt dessen kann man zu dem Gemisch einen Löffel voll kleiner Glaskugeln (40 bis 50 Stück mit einem Durchmesser von etwa 4 mm) hinzugeben und das Ganze durch Schwenken des Kolbens mischen. Mitunter empfiehlt es sich auch, den dickflüssigen Rückstand über den Dämpfen eines siedenden Wasserbades schwach zu erwärmen.

<sup>2</sup> Hat man mit Glaskugeln gemischt, so gießt man die wäßrige Lösung samt dem Niederschlag von den Kugeln in ein Becherglas ab. Dabei sind die Kolben mehrmals mit wenig Wasser abzuspülen.

<sup>3</sup> C. ZÄCH: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1929, 20, 14.

<sup>4</sup> Um Verluste durch Stoßen beim Sieden zu vermeiden, bringt man die Flüssigkeit in Anteilen von 2—3 ccm in das Rohr; besser ist es, mit einer Capillare zu arbeiten.

<sup>5</sup> Die Reinheit der Reagenzien muß besonders geprüft werden.



mit einem Korkstopfen, setzt auf seine Mündung einen durchbohrten Korkstopfen (nicht Gummistopfen!) mit einem als Luftkühler wirkenden Glasrohr und erhitzt eine halbe Stunde im siedenden Wasserbad.

Schließlich wird die Flüssigkeit wie oben im luftverdünnten Raum verdampft und unter zweimaliger Zugabe von je 2 ccm Wasser endgültig zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mit 1—3 ccm<sup>1</sup> heißem Wasser aufgenommen und die heiße Lösung durch ein kleines Filter gefiltert. Das Filtrat fängt man in einem Schälchen auf und engt nach Bedarf so weit ein, daß beim Abkühlen eine ganz schwache Trübung eintritt. Scheiden sich innerhalb weniger Stunden keine Krystalle aus, so impft man mit einer kaum sichtbaren Spur von krystallisiertem Hexaäcetylsorbit. Scheidet sich die Acetylverbindung in öligen Tröpfchen ab, so löst man sie in Alkohol, verdünnt mit Wasser und engt auf dem Wasserbade ein, bis sich die Flüssigkeit zu trüben beginnt. Die ausgeschiedenen Krystalle des Hexaäcetylsorbit werden auf einem Scheibchen gehärteten Filtrierpapiers, das auf einer Siebplatte liegt, abgesogen, mit wenig Wasser gewaschen und im luftverdünnten Raum getrocknet. Gewöhnlich zeigen sie so einen Schmelzpunkt von 97<sup>0</sup>, während der Schmelzpunkt der reinen Verbindung 98—99<sup>0</sup> beträgt. Die Krystallform ist nach den Angaben von H. JAHR<sup>2</sup> zu prüfen.

Das Ergebnis der Untersuchung darf nicht in die einfache Angabe zusammengefaßt werden, Sorbit sei gefunden worden oder Sorbit sei nicht nachweisbar, sondern es ist anzugeben:

1. Verhalten des Abdampfrückstandes nach dem Vermischen mit Benzaldehyd und Schwefelsäure:

a) nach . . . stündigem Stehen (z. B. noch leichtflüssig, zähflüssig, teilweise oder vollständig erstarrt usw.);

b) nach Zusatz von 100 ccm Wasser (z. B. keine Abscheidung von Flocken, geringe, starke Abscheidung usw.).

2. Verhalten der Acetylverbindung:

a) Krystallform,

b) Schmelzpunkt.

Daran hat sich eine kurze Beurteilung des Untersuchungsergebnisses zu schließen.

Abweichungen von dieser Vorschrift sind zulässig, doch ist anzugeben, daß und aus welchem Grunde sie erfolgten.

γ) Die vorstehende Einheitsvorschrift ist aus den Angaben von WERDER und einer Anzahl von weiteren Beobachtungen anderer Forscher hervorgegangen, die insbesondere ergeben haben, daß die Abscheidung des Benzalsorbit in quantitativer Hinsicht durch verschiedene Stoffe gestört werden kann.

Von diesen und weiteren Arbeiten über Sorbitnachweis seien folgende genannt:

C. VON DER HEIDE und K. HENNING<sup>3</sup> extrahieren den mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschenen Niederschlag mit Benzol, wobei nur Dibenzalsorbit in Lösung geht, und Gips zurückbleibt; beim Abdestillieren scheidet sich dann die Sorbitverbindung ab und wird durch den Schmelzpunkt (bei 162<sup>0</sup>) identifiziert. G. REIF<sup>4</sup> untersuchte den Einfluß verschiedener Zuckerarten auf die Abscheidung mit Benzaldehyd. Am wenigsten störte Glucose, stärker Saccharose, Invertzucker, am stärksten Stärke- und Stärke-sirup. Die Ursache war im letzteren Falle besonders das Dextrin. Zur Abtrennung des Dextrins erwies sich ein Ausziehen des dextrinhaltigen Destillationsrückstandes der zu prüfenden Flüssigkeit mit siedendem absol. Alkohol, in dem sich der Sorbit löste, das Dextrin aber nicht, als geeignet. B. BLEYER, W. DIEMAIR und G. LIX<sup>5</sup> entfernen die Dextrine durch Ausfällen mit eisgekühltem Methylalkohol. H. KREIS und R. VIOLLIER<sup>6</sup> lassen das mit Benzaldehyd in einem besonderen Rohrkolben entstehende Reaktionsgemisch über Nacht im Eisschrank stehen, zentrifugieren ab, waschen zweimal mit kaltem Wasser den Niederschlag aus und beobachten diesen im Polarisationsmikroskop. Ist er nicht deutlich doppelbrechend, so darf mit größter Wahrscheinlichkeit die Abwesenheit von

<sup>1</sup> Mitunter sind bis 5 ccm Wasser nötig, um die ölige Schicht in Lösung zu bringen.

<sup>2</sup> H. JAHR: Z. 1930, 59, 287.

<sup>3</sup> C. VON DER HEIDE u. K. HENNING: Z. 1929, 57, 240.

<sup>4</sup> G. REIF: Z. 1930, 59, 99.

<sup>5</sup> B. BLEYER, W. DIEMAIR u. G. LIX: Z. 1931, 62, 297.

<sup>6</sup> H. KREIS u. R. VIOLLIER: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 231.

Sorbit angenommen werden. Benzalmannit und Gips liefern deutlich ausgebildete und doppelbrechende Krystalle und werden an der Krystallform<sup>1</sup> erkannt. Abbildungen der verschiedenen Formen der Krystalle und Krystallaggregate von Hexaacetylsorbit mit dem charakteristischen Kantenwinkel von etwa 110° zeigen J. SCHINDLER und J. KOZAK<sup>2</sup>. A. RÖHLING und J. RICHARZ<sup>3</sup> benutzen zur Unterscheidung von Dibenzalsorbit und Tribenzalmannit, der in Nadeln krystallisiert, außer der Krystallform den Schmelzpunkt (160—200° bzw. 214—217°) und die Fluorescenz im ultravioletten Licht (weiß mit gelbgrünem Stich bzw. tiefdunkelviolett). Auch kondensiert sich nach ihnen Mannit mit Benzaldehyd weniger leicht als Sorbit. Durch Krystallisation aus Essigester erhielten W. DIEMAIR und G. LIX<sup>4</sup> Monobenzalsorbit in gut ausgebildeten Krystallen und fanden den Schmelzpunkt des reinen Monobenzalsorbit zu 169—170°, des reinen Dibenzalsorbit zu 182—184°. B. BLEYER und W. DIEMAIR<sup>5</sup> identifizierten den Sorbit auch als Sorbit-Triformacetal vom Schmelzpunkt 206° (Mannitverbindung 227°). Zu diesem Zwecke versetzten sie die Sorbitlösung (den bis zur Sirupdicke eingedampften Wein) mit der gleichen Gewichtsmenge 40%iger Formaldehydlösung und der gleichen Gewichtsmenge konz. Salzsäure und erwärmten 1—1½ Stunden auf dem Wasserbade am Rückflußkühler. Nach dem Erkalten schied sich das gebildete Triformacetal langsamer oder schneller in Form von Nadeln ab, die sich aus verdünntem Alkohol gut umkrystallisieren ließen.

δ) Eine direkte Abscheidung des Sorbits als Hexaacetylverbindung unter Umgehung des Benzalsorbit versuchen M. KLOSTERMANN und W. FACHMANN<sup>6</sup> wie folgt: Der mit Tierkohle vorbehandelte Wein wird zum Extrakt eingedickt und diesem der Sorbit durch Ausschütteln mit Methylalkohol entzogen. Der Auszug wird mit Bleiessig gereinigt, der Bleiüberschuß im Filtrat durch Schwefelwasserstoff entfernt und die Sorbitlösung eingedampft, zuletzt im Vakuum. Zum Rückstand gibt man 3 ccm Pyridin, 9 ccm Essigsäureanhydrid und erwärmt 45 Minuten im siedenden Wasserbade. Nach Erkalten fügt man 20 ccm Wasser zu, stumpft mit Natriumcarbonatlösung ab, nimmt das Öl in Äther auf, äthert nach Übersättigen mit Kochsalz nochmals aus. Das nach Verdunsten des Äthers zurückbleibende Öl löst man in kochendem Wasser, reinigt mit Tierkohle und filtriert heiß. Das Filtrat liefert beim Erkalten besonders nach Impfen mit einem Kryställchen die reine Verbindung. Ölige Abscheidungen werden nach Reiben der Glaswand und Stehen im Eisschrank krystallinisch und zeigen dann nach Umkrystallisation den Schmelzpunkt 98—99°.—Noch ein Zusatz von 2,5% Obstwein zu Traubenwein ließ sich so nachweisen.

Über die Abscheidung des Sorbits mit o-Chlorbenzaldehyd vgl. S. 971.

#### b) Farbreaktion auf Sorbit,

richtiger auf Benzalsorbit, beruhend auf Spaltung des Benzalsorbit und Überführung des dabei freiwerdenden Benzaldehyds in Dibenzalaceton hat G. REIF<sup>7</sup> angegeben. Die Versuchsbedingungen sind durch Anwendung verdünnter Schwefelsäure von bestimmter Konzentration als Lösungsmittel so gewählt, daß Benzalmannit nicht gelöst bzw. gespalten wird und damit keine Störung verursachen kann.

Des nach S. 966 erhaltene Benzalsorbit wird durch einen Glasfrittetiegel (Schott & Gen. 1 G2) abgesogen und mit etwa 100 ccm Wasser ausgewaschen, wobei größere Stücke des Niederschlages mit Hilfe eines Glasstabes zerkleinert werden. Hierauf wird zweimal je nach der Menge des Niederschlages mit je 5—10 ccm einer in Eiswasser gekühlten Mischung aus 30 Teilen absolutem Alkohol und 70 Teilen Petroläther und hierauf zweimal mit mindestens je 10 ccm Petroläther ausgewaschen, wobei man jedesmal vor der Zugabe der einzelnen Waschflüssigkeiten das Absaugen unterbricht, dann die Waschflüssigkeit hinzugibt, mit einem Glasstab gut verrührt, bis der Niederschlag vollständig kleinteilig geworden ist, und erst hierauf stark abgesaugt. Diese Behandlung

<sup>1</sup> H. KREIS u. R. VIOLLIER geben auch Mikrophotogramme der einzelnen Verbindungen an.

<sup>2</sup> J. SCHINDLER u. J. KOZAK: Z. 1931, 62, 647.

<sup>3</sup> A. RÖHLING u. J. RICHARZ: Chem.-Ztg. 1930, 54, 61; C. 1930, I, 1551.

<sup>4</sup> W. DIEMAIR u. G. LIX: Z. 1930, 60, 304.

<sup>5</sup> B. BLEYER u. W. DIEMAIR: Chem.-Ztg. 1929, 53, 641.

<sup>6</sup> M. KLOSTERMANN und W. FACHMANN: Z. 1931, 61, 100.

<sup>7</sup> G. REIF: Z. 1931, 62, 82 u. 1933, 66, 408.

hat eine restlose Entfernung des Benzaldehyds zum Zweck. Der Niederschlag wird dann  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde im Trockenschrank bei 75—80° getrocknet.

0,1 bis höchstens 0,03 g des gereinigten, möglichst farblosen trockenen Niederschlags werden in ein Reagensglas gebracht und dann zuerst mit einer Pipette 0,9 ccm Wasser und hierauf 0,3 ccm reines Aceton zugegeben. Dann schwenkt man kreisförmig um und läßt hierauf auf die Mitte der Flüssigkeitsoberfläche aus einer Pipette 0,52 ccm konzentrierte Schwefelsäure (D. 1,84, D.A.B. 6) rasch tropfen. Dann wird sofort kreisförmig umgeschwenkt und das Reagensglas beiseite gestellt. Bei Anwesenheit von Benzaldehyd nimmt die

Flüssigkeit unter Auflösung der Krystalle entweder sofort oder nach einigen Minuten eine orangerote Färbung an, die in etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde ihre volle Stärke erreicht. Ist nur Benzaldehyd zugegen, so lösen sich die Krystalle nicht auf und die Flüssigkeit bleibt entweder farblos oder wird gelb.

Bei kleineren Mengen Benzaldehyd wird nur mit der Hälfte der genannten Reagenzien gearbeitet. Der Niederschlag wird hier am besten durch einen GOOCH-Tiegel, in den ein kleines Papierfilter gelegt wird, filtriert. Man wäscht den Niederschlag nacheinander mit etwa 20 ccm Wasser, dann zweimal mit je 3 ccm der Alkohol-Petroläthermischung und zweimal mit etwa je 10 ccm Petroläther aus. Das Absaugen wird dabei nicht unterbrochen und ein Umrühren mit einem Glasstab ist überflüssig. Der ausgewaschene Niederschlag wird samt dem Papierfilter  $\frac{1}{2}$  Stunde im Trockenschrank bei etwa 75° getrocknet. Dann wird das Papierfilter so gefaltet, daß der Niederschlag nach innen zu liegen kommt, und in ein Reagensglas gebracht. Hierauf gibt man 0,45 ccm Wasser und dann 0,15 ccm reines Aceton hinzu, drückt mit einem Glasstab das Filter in dem Reagensglas nieder, so daß es vollständig benetzt wird. Nach Herausnahme des Glasstabes werden auf die Mitte der Flüssigkeitsoberfläche 0,26 ccm konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise rasch hinzugegeben und sofort kreisförmig umgeschwenkt. Bei Anwesenheit von Benzaldehyd entsteht allmählich, bei sehr kleinen Mengen nach etwa 1 Stunde eine orangerote Färbung. Ist nur Benzaldehyd zugegen, so bleibt die Flüssigkeit gelblich. — Auf diese Weise lassen sich noch 3% Apfelwein in Traubenwein sicher nachweisen.

Die vorstehende Prüfung nach REIF wurde von H. KREIPE<sup>1</sup> nachgeprüft und ihre Brauchbarkeit bestätigt.

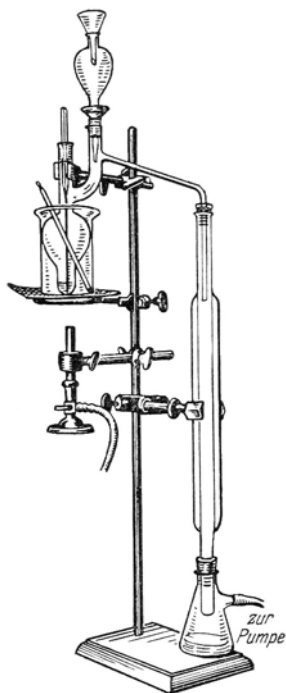


Abb. 17. Apparat zum Einengen der sorbitalthaltigen Lösung nach BLEYER, DIEMAIR und LIX.

c) Bestimmung des Sorbits nach B. BLEYER, W. DIEMAIR und G. LIX<sup>2</sup>.

100 ccm des vergorenen Untersuchungsmaterials werden mit 5 g Kohle (Carbo medicinalis D.A.B. 6, MERCK) versetzt, durchgeschüttelt, 3 Minuten zum Sieden erhitzt, heiß filtriert und das klare farblose Filtrat bei 60—70° in einem 100 ccm fassenden CLAISEN-Kolben im Vakuum eingedampft. Die Lösung durch einen Tropftrichter allmählich unter Nachspülen mit destilliertem Wasser zugegeben. Der beim Eindampfen entstehende Sirup soll auch in der Kälte noch dünnflüssig und leicht beweglich sein.

Nach Entfernung der Capillare und des Tropftrichters versetzt man den erhaltenen Rückstand unter Umschütteln portionsweise mit wasserfreiem Methylalkohol, wodurch eine dicke, flockige, farblose Fällung entsteht. Um Verluste durch Ankleben an der Gefäßwand zu vermeiden, fügt man einige Glasperlen hinzu und schüttelt unter gleichzeitiger Erwärmung auf dem Wasserbad gut um.

<sup>1</sup> H. KREIPE: Z. 1934, 67, 426—428.

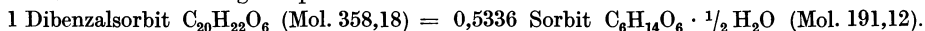
<sup>2</sup> B. BLEYER, W. DIEMAIR u. G. LIX: Z. 1932, 64, 337.

Die einzelnen Methylalkoholanteile samt Niederschlag werden in einem etwa 100 ccm fassenden Kölbchen gesammelt und der Destillierkolben nochmals mit Methylalkohol nachgespült. Für die ganze Behandlung sollen 40 ccm Methylalkohol verwendet werden. Setzt sich der entstandene Niederschlag nicht sofort klar ab, so erhitzt man den Inhalt des Kölbchens nochmals auf dem Wasserbade zum Sieden, wodurch der Niederschlag flockig und die überstehende Flüssigkeit klar wird. Man läßt sie einige Zeit im Eisschrank stehen und filtriert dann durch ein kleines Filter ab, worauf man mit Methylalkohol nachwäscht.

Das erhaltene Filtrat wird in dem abgebildeten Kolben unter den angegebenen Bedingungen eingedampft und die Destillation soweit getrieben, bis bei 70° und 12 mm Druck nichts mehr übergeht. Der dabei erhaltene Sirup muß bei richtiger Behandlung nach Abkühlung kaum noch beweglich sein. Eine etwaige Braunfärbung ist belanglos.

Nun versetzt man den Rückstand mit 0,2 bis 0,6 ccm frisch destilliertem Benzaldehyd und mit 1 ccm 50 Vol.-%iger Schwefelsäure. Dieses Gemisch wird nun mit Hilfe eines mechanischen Rührwerks 2 Stunden bei etwa 10—12° gründlich durchgerührt. Hierauf läßt man über Nacht im Eisschrank stehen. Der Niederschlag wird mit 100 ccm kaltem Wasser quantitativ in einen gewogenen Filtertiegel gespült und der etwa noch vorhandene Benzaldehyd bzw. die Benzoesäure werden durch Nachwaschen mit 10 ccm 50%igem Alkohol entfernt. Der erhaltene weiße bis gelblichweiße leicht pulverisierbare Niederschlag von Dibenzalsorbit wird 3 Stunden bei 70° getrocknet und dann gewogen. Zeigt eine Probe des Niederschlags unter dem Mikroskop die Gegenwart von Tribenzalmannit an, so kann das Kondensationsprodukt auf dem Tiegel mit etwa 5 ccm heißem Aceton 1—2mal behandelt werden. Dadurch löst sich der Dibenzalsorbit sofort und sehr leicht auf, während der Tribenzalmannit nur sehr schwer löslich ist. Der zurückbleibende Tribenzalmannit wird getrocknet, zurückgewogen und der gefundene Wert von dem ursprünglich ermittelten abgezogen. Da Tribenzalmannit in heißem Aceton nicht vollkommen unlöslich ist, hat die Behandlung allerdings keinen Anspruch auf absolute Genauigkeit.

Für die Berechnung entsprechen



#### d) Abscheidung des Sorbits als Chlortribenzalsorbit nach F. M. LITERSCHIED.

Eine dem Benzaldehyd anhaftende Reaktionsträgheit kann nach E. VOGT<sup>1</sup> zur Folge haben, daß unter gewissen Umständen bei dem Verfahren von WERDER die Abscheidung des Dibenzalsorbites auch bei Gegenwart von Sorbit ausbleibt. Als derartige Fehlerquellen fand VOGT vor allem Alter und Zersetzung des verwendeten Benzaldehyds, unrichtige Konsistenz des Eindampfdruckstandes und ungenügende Durchmischung der Reaktionskomponenten.

Entsprechend der Erfahrung, daß gewisse Substitutionsprodukte des Benzaldehyds wesentlich stärker reagieren als dieser selbst, erwies sich in der Tat

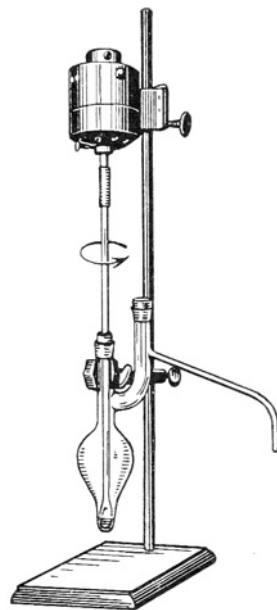


Abb. 18. Apparat zur Kondensation der sorbithaltigen Lösung nach BLEYER, DIEMAIR und LIX.

<sup>1</sup> E. VOGT: Z. 1934, 67, 407—425.

o-Chlorbenzaldehyd nach der Arbeitsweise von F. M. LITTELSCHIED<sup>1</sup> als Abscheidungsmittel dem Benzaldehyd weit überlegen. Die größere Reaktionsfähigkeit erlaubt nicht nur eine bedeutende Vereinfachung der Behandlung sondern läßt auch noch Sorbitreste erfassen, die nach dem WERDERSCHEN Verfahren in Lösung bleiben. Dazu kommt, daß das Kondensationsprodukt o-Chlortribenzalsorbit  $C_6H_8(OH)_3 \cdot (C_6H_4Cl \cdot CO)_3$  krystallinisch ist und direkt auf seinen Schmelzpunkt geprüft werden kann. Nach den Angaben von LITTELSCHIED und VOGT wird die Prüfung wie folgt ausgeführt:

Die mit Kohle vorbehandelte<sup>2</sup> Flüssigkeit (Wein) dampft man in offenen Glasschalen auf dem Wasserbade auf 5 bis höchstens 4 ccm ein, filtriert nach dem Erkalten von ausgeschiedenem Weinstein durch ein Trichterchen mit kleinem Wattebausch in einen graduierten Schüttelzylinder unter 4—5maligem Nachwaschen mit je 5 Tropfen Wasser, so daß das Volumen des Filtrates 6 ccm nicht übersteigt. Dazu setzt man das doppelte Volumen konzentrierter Salzsäure (D. 1,18—1,19), schüttelt um und fügt 0,20—0,25 ccm (6—8 Tropfen) o-Chlorbenzaldehyd<sup>3</sup> hinzu, schüttelt etwa 1 Minute und nach einer halben Stunde nochmals kräftig durch. Dann läßt man die Mischung 6—8 Stunden ruhig stehen.

Bei Gegenwart von Sorbit tritt eine meist an der Oberfläche sich ansammelnde weißlichgelbe Abscheidung (I) auf, die man auf einem Filter sammelt. Das zunächst ohne Auswaschen Abfließende fängt man in einem Schütteltrichter gesondert auf, fügt nochmals etwa 4—6 Tropfen o-Chlorbenzaldehyd hinzu und stellt wieder 4—5 Stunden beseite. Eine weitere Abscheidung (II) ist auf demselben Filter zu sammeln. Die anfangs relativ voluminösen, flockigen Abscheidungen werden nach und nach auf dem Filter mit 50—60 ccm kaltem Wasser, dann mit etwa 75 ccm kaltem Methylalkohol ausgewaschen<sup>4</sup>, indem man kompaktere Anteile mit dem Glasstab oder nach Einbringen in ein Schälchen zerteilt. Nach dem Trocknen bei 105° (1/2 Stunde) liegt der Schmelzpunkt dieses rein weißen Misch-Kondensproduktes, das oft hartnäckig o-Chlorbenzaldehyd zurückhält, zwischen 175—210°, meist zwischen 190—200°.

VOGT fand den Schmelzpunkt bei 94 nicht umkrystallisierten Niederschlägen bei:

|                   |          |          |          |           |
|-------------------|----------|----------|----------|-----------|
| Temperatur . . .  | 185—190° | 191—195° | 196—200° | über 200° |
| Zahl der Proben . | 7        | 31       | 39       | 17        |

o-Chlortribenzalsorbit läßt sich ferner nach ZÄCH (vgl. S. 967) leicht und sicher in Hexaacetylsorbit überführen. Zur Entfernung weißer, bei der Aufspaltung des Chlorbenzalsorbites dabei häufig zurückbleibender Flocken empfiehlt VOGT nach völligem Abdunsten mit Salzsäure und Verschwinden des Geruchs nach Chlorbenzaldehyd den zurückbleibenden Sorbit in wenig heißem Wasser zu lösen und die Verunreinigung abzufiltrieren. Hierdurch wird eine weitere Reinigung überflüssig. Ein zweistündiges Stehen auf dem Wasserbad bei der Acetylierung lieferte bessere Ergebnisse als nur einstündiges Erhitzen. Sehr schöne große Krystalle erhielt VOGT, wenn er den noch flüssigen Hexaacetylsorbit mit einem heißen Gemisch von Wasser und Methanol aufnahm und die Lösung bei Zimmertemperatur eindunsten ließ. Die Krystalle zeigten unter dem Mikroskop eindeutig ihre

<sup>1</sup> F. M. LITTELSCHIED: Z. 1931, 62, 653.

<sup>2</sup> Längeres Kochen des Weines mit Kohle kann nach VOGT die Sorbitausbeute verringern, kurzes Kochen oder kalte Behandlung hatte keine Verluste zur Folge.

<sup>3</sup> Der in Ampullen zu 5 g zu beziehende o-Chlorbenzaldehyd (Schmelzpunkt 11°, Siedepunkt 208°) ist luftdicht (mit Wachshütchen) im Dunkeln aufzubewahren. — Ungefähr 0,05 g Sorbit in 5 ccm Wasser gelöst, müssen nach Beimischung von 10 ccm konzentrierter Salzsäure und etwa 8 Tropfen des Aldehyds nach 6 Stunden eine deutliche weißliche Abscheidung liefern. 5 ccm Wasser mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure und 8 Tropfen des Aldehyds vermischt, dürfen nach 12 Stunden keine deutlich erkennbare weißliche Abscheidung zeigen.

<sup>4</sup> Die beim ersten Auswaschen auftretende milchige Trübung des Filtrates kann unbeachtet bleiben.

sehr charakteristischen Endflächen und schmolzen ohne weitere Umkrystallisierung zwischen 97—99°.

Tritt beim Schütteln mit o-Chlorbenzaldehyd nach obigen Versuchen innerhalb 6—8 Stunden nur eine geringe ölige (o-Chlorbenzaldehyd) oder meist auf dem Boden des Schüttelzylinders ruhende geringe klebrige, von einigen krümeligen festen Anteilen durchsetzte, Abscheidung ein, so ist auf Abwesenheit von Sorbit zu schließen.

Bei Gegenwart von viel Sorbit lassen sich in dem Filtrat von II noch weitere Abscheidungen der Sorbitverbindung erhalten (III usw.). Schließlich kann es aber auch bei Anwesenheit von Mannit zur Entstehung von Mannitkondensat kommen, das jedoch einen Schmelzpunkt über 260° aufweist.

Durch sinngemäße Anwendung der Zentrifuge lassen sich obige Behandlungen vereinfachen.

Bei der Nachprüfung des Verfahrens fand VOGT, daß seine Empfindlichkeit außerordentlich groß ist. 2—3% Obstwein in Traubenwein waren in vielen Fällen noch nachweisbar. Ein Zucker- und Dextringehalt beeinträchtigt das Ergebnis der Prüfung nicht. Die Art des Eindampfens, ob in offener Schale auf 4—5 ccm, ob zur Trockne oder im Vakuum war ohne Einfluß. Ein häufigeres Schütteln als nach der Vorschrift erwies sich als überflüssig. Die Kondensation erfolgt bei Zimmertemperatur ebenso gründlich wie z. B. bei —5 bis —7°. Ein sehr langes und gründliches Auswaschen des Tribenzalsorbit mit Methanol vermindert die Menge des Niederschlages nicht.

Die erhaltenen Mengen Tribenzalsorbit gehen ungefähr den vorhandenen Sorbitmengen parallel; doch ist das Verfahren in der vorliegenden Form zunächst noch als qualitatives anzusehen. Von zugesetzten Mengen Sorbit wurden aus wäßriger Lösung 75—98% der berechneten als Chlortribenzalsorbit gefunden. Bei sinngemäßer Anwendung der in vorstehenden Abschnitten beschriebenen Maßnahmen kann aber eine Erhöhung der Ausbeute an dem Kondensationsprodukt erwartet werden. Bei dessen Umwandlung in Hexaacetylsorbit betrug die Ausbeute im Mittel 66% der theoretischen.

VOGT stellte auch fest, daß Mikroorganismen wie Essigbakterien, Kahlhefen u. dgl. den Nachweis des Sorbits durch Zerstörung desselben nicht verhindern. Ähnliche Angaben hat O. KALBERER<sup>1</sup> gemacht, und H. KREIPE<sup>2</sup> verwendet die Prüfung auf Sorbit (nach WERDER-REIF) zum Nachweis einer Verfälschung von Weinessig mit Obstweinessig.

### 3. Nachweis von Inosit.

Inosit krystallisiert wasserfrei aus heißer Essigsäure oder Wasser in blumenkohlartig gruppierten Nadeln. Einen wasserhaltigen Inosit erhält man aus Wasser unter 50° in monoklinprismatischen sechsseitigen Krystallen. Er kommt in tierischen und pflanzlichen Stoffen weitverbreitet vor, in pflanzlichen Stoffen vorwiegend an Phosphorsäure gebunden in Form von Phytin, das als solches besser als der freie Inosit bestimmt werden kann. Zur Prüfung auf beide Stoffe sind folgende Verfahren vorgeschlagen worden:

#### a) Nachweis von Inosit mit Bleiacetat nach A. HILGER<sup>3</sup>.

1 Liter der zu prüfenden Lösung (Wein) wird auf dem Wasserbade auf die Hälfte eingedampft und zur teilweisen Abscheidung der Säuren mit Barytwasser neutralisiert. Man filtriert die Flüssigkeit ab, versetzt das Filtrat mit einer Lösung von neutralem Bleiacetat, filtriert die Flüssigkeit von dem Bleiniederschlag ab, fällt das überschüssige Blei aus dem Filtrate durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, filtriert die Flüssigkeit von dem Schwefelbleiniederschlag ab und trocknet das Filtrat auf dem Wasserbade vollständig ein. Der trockene Rückstand wird mehrere Male mit wasserfreiem Alkohol ausgekocht, alsdann in heißem Wasser gelöst und mit einer Lösung von basischem Bleiacetat versetzt; dadurch wird der Inosit gefällt. Man trennt den Bleinieder-

<sup>1</sup> O. KALBERER: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1930, 21, 93.

<sup>2</sup> H. KREIPE: Z. 1934, 67, 426.

<sup>3</sup> A. HILGER: Ann. Chim. Pharm. 1871, 160, 333. — Nach K. WINDISCH: Die chemische Untersuchung des Weines. Berlin 1896.

schlag durch Filtrieren von der Flüssigkeit, verteilt ihn in Wasser und zerlegt ihn durch Einleiten von Schwefelwasserstoff. Man filtriert die Flüssigkeit von dem Schwefelblei ab, dampft sie stark ein und versetzt sie mit einer Mischung von 10 Raumteilen wasserfreiem Alkohol und 1 Raumteil Äther, bis eine Ausscheidung erfolgt. Nach fünf- bis sechstägigem Stehen bei niedriger Temperatur (am besten in Eis) scheidet sich der Inosit in blumenkohlartig gruppierten Formen krystallinisch aus. Die noch schwach gefärbten, mit anderen organischen Stoffen verunreinigten Inositkrystalle werden durch wiederholtes Auflösen und Fällern mit der oben angegebenen Alkohol-Äthermischung gereinigt; schließlich hinterbleiben farblose Krystalle von reinem Inosit.

Das blumenkohlartige Aussehen der Krystalle ist ein sicheres Erkennungszeichen für den Inosit. Zur näheren Kennzeichnung führt man noch die folgende Reaktion von J. SCHERER<sup>1</sup> aus; Eine kleine Menge der noch verunreinigten krystallinischen Abscheidung wird auf dem Deckel eines Platintiegels in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit einigen Tropfen Salpetersäure versetzt und auf dem Wasserbade vollständig eingetrocknet. Man übergießt den Rückstand mit etwas Ammoniak und Calciumchlorid und trocknet die Mischung vorsichtig ein. Bei Gegenwart von Inosit (noch bei 0,5 mg) hinterbleibt ein rosenroter Fleck von Tetraoxychinon bzw. Dioxydichinon oder Rhodizonsäure.

Viel sicherer gelingt der Nachweis von Inosit durch Rhodizonsäurebildung nach F. FISCHLER und F. H. KÜRTE<sup>2</sup> durch alkalische Oxydation. Man verreibt die trockene Substanz mit etwa  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  ihres Gewichts mit Bariumsuperoxyd, fügt 1 Tropfen Wasser hinzu, rührt wieder gut durch, so daß ein dicklicher Brei entsteht und läßt über einer Flamme eintrocknen. Nach dem Erkalten bringt man die gleiche Menge Natriumsuperoxyd und Wasser auf die eingetrocknete Substanz und verteilt das Ganze durch Mischen mit dem Glasstab möglichst dünn und flächenhaft im Schälchen.

Bei dem Versuch darf man nur mit Substanzmengen von 0,01 g und weniger arbeiten, da bei Anwendung größerer Mengen bei Wasserzugabe unter Umständen spontane Verbrennung erfolgen kann.

Die Erwärmung des Schälchens geschieht zweckmäßigerweise so, daß man es in Höhe von 6—8 cm über eine nicht leuchtende Bunsenflamme hält. Dabei entweicht der Sauerstoff unter Bildung eines feinen Schaumes. Gleichzeitig tritt Verfärbung nach Gelbolivenfarbe ein. Nach dem Erkalten läßt man vorsichtig vom Rande des Schälchens her einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zufließen, wobei die Farbe in ein starkes Rot umschlägt, das längere Zeit bestehen bleibt.

J. NEEDHAM<sup>3</sup> fällt auch Inosit, aus Phytin durch Hydrolyse gewonnen, mit basischem Bleiacetat (Bleizucker), zerlegt den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, zieht das Schwefelblei bei 70° mit Wasser aus und fällt quantitativ durch Eindampfen des Auszuges auf etwa 20 ccm mit 300 ccm absolutem Alkohol. — Er fand, daß Inosit aus Muskelfleisch mit dem aus Phytin identisch war.

#### b) Darstellung, Nachweis und Bestimmung von Phytin.

Die Darstellung und Bestimmung des von S. POSTERNACK entdeckten und von WINTERSTEIN als Inositphosphorsäure erkannten Phytins wird dadurch erschwert, daß ein pflanzliches Enzym, die Phytase, das Phytin in schwachsaurer Lösung unter Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure angreift.

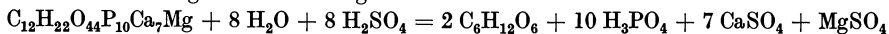
<sup>1</sup> J. SCHERER: Verhandl. Deutsch. physikal.-medizin. Ges. in Würzburg 1851, 2, 212; Ann. Chem. Pharm. 1852, 81, 375.

<sup>2</sup> F. FISCHLER u. F. H. KÜRTE: Biochem. Zeitschr. 1932, 254, 138.

<sup>3</sup> J. NEEDHAM: Biochem. Journ. 1923, 17, 422; C. 1923, IV, 386.

α) Darstellung des Phytins. G. CLARKE<sup>1</sup> zog die Samen von *Brassica juncea* und *B. campestris* mehrere Tage mit Petroläther aus. Der Petrolätherauszug wurde mittels Zentrifuge abgetrennt, während die Samen einige Stunden an der Sonne getrocknet wurden. Die lufttrockene fettfreie Substanz wurde dann 7 Tage mit 4,5%iger Essigsäure ausgezogen. Das Extrakt wurde von den Samen getrennt, 15 Minuten gekocht und abgekühlt. Durch das Kochen wurde ein großer Teil des Proteins abgeschieden. Über Nacht hatte sich der Niederschlag abgesetzt; die darüber bestehende dunkelbraune Flüssigkeit ließ sich leicht abpipettieren und wurde nochmals gekocht, wobei sich eine sehr geringe Menge Phytin abschied, die vernachlässigt wurde. Zu der kochenden Lösung wurde nunmehr Ammoniak zugesetzt, bis die Flüssigkeit gerade alkalisch reagierte, und das Kochen 5 Minuten fortgesetzt. Die so entstehende große Niederschlagsmenge wurde 2—3 Stunden mit 80%iger Essigsäure unter ständigem Schütteln extrahiert. Der Extrakt wurde von den ungelösten organischen Verbindungen getrennt, aufgekocht, über Nacht abgekühlt und die kalte Lösung kräftig gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, die klare Lösung aufgekocht und bis zur alkalischen Reaktion mit Ammoniak versetzt. Der weiße Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und tüchtig mit heißem Wasser ausgewaschen. Die weiße Fällung bestand aus Phytin und Calcium-Magnesium-Ammonium-Phosphat; der Niederschlag wurde wieder in 8%iger Essigsäure gelöst und der unlösliche Rückstand abfiltriert. Nunmehr wurde die kalte Lösung einige Minuten gekocht, wobei sich ein großer Teil des Phytins rein abschied. Es wurde heiß abfiltriert, mit heißem Wasser und endlich mit Alkohol gewaschen. Die Ausbeute betrug 0,38% der lufttrockenen fettfreien Samen.

Nach CLARKE hat das reine Phytin die Formel  $C_{12}H_{22}O_{44}P_{10}Ca_7Mg$ . Bei der Hydrolyse zerfällt es nach folgender Gleichung:



J. ANDERSON<sup>2</sup> erhielt aus Baumwollsaamenmehl durch Extraktion mit 0,2%iger Salzsäure und nachfolgender Behandlung des Auszuges mit Bariumchlorid, Salzsäure, Barytwasser und Alkohol ein schneeweißes Pulver von der Zusammensetzung  $C_6H_{12}O_{24}P_6Ba_3$ . Diese Verbindung, in verdünnter Salzsäure gelöst, mit Barytwasser versetzt und kurze Zeit erwärmt, schied nach dem Erkalten ein Pulver von der Zusammensetzung  $Ba_7(C_6H_{11}O_{24}P_6)_2$  aus. Die entsprechende freie Säure, Inosithexaphosphat,  $C_6H_{18}O_{24}P_6$  wurde als sirupöse farblose Masse erhalten. Das Bariumsalz  $C_6H_{12}O_{24}P_6Ba_3$  erhielt Anderson auch aus Hafer, Mais und anderen Samen. Über die Konstitution des Phytins vgl. POSTERNACK<sup>3</sup>.

β) Nachweis des Phytins. F. FISCHLER und F. H. KÜRTE- geben für Phytin und verschiedene Salze des Phytins folgende Ausführungsform der Rhodizonsäurereaktion (vgl. oben) an: 0,01 g oder weniger der trockenen Substanz werden mit etwa  $\frac{1}{4}$  des Gewichts mit feingepulvertem Natrium-superoxyd in einem Schälchen mit einem Glasstab innig durchgemischt, dann 1—2 Tropfen Wasser hinzugefügt, so daß ein dicklicher Brei entsteht, flächenhaft mit dem Glasstab verrieben und wie oben (S. 974) zur Trockne eingedampft. Jetzt tritt schon bei Calcium-Magnesium- und Natriumphytinaten eine bräunlichgelbe Farbe auf, die bald einem helleren, bisweilen ganz schwach gelblichen Farbton weicht. Bei vorsichtigem Weitererhitzen tritt nach etwa 1—3 Minuten, während derer man das Schälchen hier und da aus dem Erwärmungsbereich der Flamme entfernt, an einzelnen Stellen eine deutlich rötliche Farbe auf, die allmählich fast carminfarben wird und das ganze Gemisch ergreift. Man muß jetzt besonders vorsichtig erhitzen, da sonst Verkohlungen eintritt. — Beim Bariumsalz fehlt die gelbbraune Anfangsverfärbung, und die Schlußrotfärbung hat einen mehr Ziegelrosafarbton, der sehr charakteristisch ist. — Nach dem Abkühlen setzt man dem Reaktionsgemisch wieder einige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure vom Rande des Schälchens her zu. Im Gegensatz zu Inositol tritt nun eine deutlich grüne bis olivengrüne Verfärbung auf, die lange bestehen bleibt. Beim Erwärmen des Gemisches verändert sie sich zunächst nicht, viel später tritt Gelbfärbung und schließlich Farblosigkeit auf.

γ) Bestimmung des Phytins: L. ADLER<sup>4</sup> verwendet zur Trennung der anorganischen Phosphate von Phytin Ammoniummolybdat. Wenn man die von v. LORENZ

<sup>1</sup> G. CLARKE: Journ. Chim. Soc. 1914, 105, 535; Z. 1917, 33, 261.

<sup>2</sup> J. ANDERSON: Journ. Biol. Chem. 1914, 17, 141; Z. 1917, 33, 425.

<sup>3</sup> S. POSTERNACK: Compt. rend. Paris 1919, 169, 138; C. 1919, III, 1053.

<sup>4</sup> L. ADLER: Biochem. Zeitschr. 1916, 75, 319; C. 1916, II, 405.



vorgeschriebene Mischung von Salpetersäure und Schwefelsäure mit Wasser 2:3 verdünnt, in dieser Flüssigkeit die zu analysierende Substanz zu einem Gesamtvolumen von 50 ccm gelöst auf 50° erwärmt und mit der Ammoniummolybdatlösung fällt, wird das Phytin nicht im mindesten angegriffen, während es seinerseits selbst in Mengen von 0,5 g die Fällbarkeit selbst kleiner Mengen von Phosphorsäure nicht beeinträchtigt.

K. LINDENFELD<sup>1</sup> löst 0,1—0,3 g Substanz in 3 ccm 10%iger Salpetersäure<sup>2</sup>, setzt 20 ccm 25%iger Ammonnitratlösung und 11 ccm Wasser zu, gibt zu der kalten Lösung 6 ccm frisch filtrierte Ammoniummolybdatlösung nach v. LORENZ und rührt  $\frac{1}{2}$  Minute. Nach 3 bis 4 Stunden wird der Niederschlag filtriert, mit einer schwach salpetersauren 2%igen Ammoniumnitratlösung, dann mit Alkohol, schließlich mit Aceton nachgewaschen,  $\frac{1}{2}$  Stunde im Vakuum getrocknet und gewogen. Mit dem Faktor 0,01525 erhält man daraus, berechnet als P, den anorganischen Phosphor.

E. ARBENZ<sup>3</sup> empfiehlt zur Phytinbestimmung in Nahrungsmitteln das Titrationsverfahren von HEUBNER und STADLER<sup>4</sup> in folgender Form: Die zu untersuchenden Proben werden entweder sofort oder nach Trocknen bei 36° fein gepulvert und entfettet und gewogene Mengen davon mit bekannten Mengen 0,6%iger Salzsäure versetzt, geschüttelt und nach einigen Stunden abfiltriert. Der Rückstand wird wieder mit Salzsäure ausgezogen und dies so oft wiederholt, bis die Filtrate phytinfrei sind. Zu je 20 ccm Filtrat werden dann 10 ccm 3%ige Ammoniumrhodanidlösung gegeben; dann wird mit 0,6%iger Salzsäure zu 100 ccm aufgefüllt und mit einer Eisenchloridlösung von bekanntem Gehalte (0,05—2% Fe) titriert. Jedem mg Eisen entspricht ziemlich genau 1,19 mg Phytinphosphor. Zur Extraktion der einzelnen Stoffe waren meist eine große Zahl, bis zu 12, Auszüge und langwierige Filtrationen nötig um alles Phytin in Lösung zu bringen.

Gefunden wurde so der Phytin Gehalt (bezogen auf Trockensubstanz) für

|                       |         |                     |         |                  |         |
|-----------------------|---------|---------------------|---------|------------------|---------|
| Reiskleie . . . . .   | 4,232 % | Weißmehl . . . . .  | 0,208 % | Linsen . . . . . | 0,326 % |
| Reismehl . . . . .    | 0,216 „ | Maismehl . . . . .  | 0,857 „ | Erbsen . . . . . | 0,561 „ |
| Weizenkleie . . . . . | 5,073 „ | Hafermehl . . . . . | 0,506 „ | Kakao . . . . .  | 2,230 „ |
| Vollmehl . . . . .    | 0,572 „ |                     |         |                  |         |

Kein Phytin wurde gefunden in gelben und weißen Rüben, Blumenkohl, Rosenkohl, Grünkohl, Spinat, Spargeln, Äpfeln, Birnen und Feigen.

Auch K. LINDENFELD<sup>1</sup> bestimmt die Phytinphosphorsäure in Inositphosphorsäurepräparaten nach dieser Methode, verwendet jedoch dabei den Umrechnungsfaktor 1,20.

A. RIPPEL<sup>5</sup> erzielt bei Versuchen zur Trennung des Phytins von der anorganischen Phosphorsäure durch Ausfällen des Phytins mit Kupferacetat, Silberacetat, Bariumacetat, Calciumchlorid und Eisenchlorid keine günstigen Ergebnisse.

### Buch-Literatur.

H. BUNTE: Encyclopädisches Handbuch der Technischen Chemie (MUSPRATTS Chemie), 4. Aufl., Bd. 10 (Zucker). Braunschweig 1922. — J. GROSSFELD: Anleitung zur Untersuchung der Lebensmittel. Berlin: Julius Springer 1927. — A. W. VAN DER HAAR: Anleitung zum Nachweis zur Trennung und Bestimmung der reinen und aus Glucosiden usw. erhaltenen Monosaccharide und Aldehydsäuren. Berlin: Gebrüder Bornträger 1920. — E. O. VON LIPPMANN: Die Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1904. — H. MEYER: Lehrbuch der organisch-chemischen Methodik. Berlin: Julius Springer 1931 u. 1933. — M. SAMEC: Kolloidchemie der Stärke, Handbuch der Kolloidwissenschaft, Bd. 2. Dresden: Theodor Steinkopff 1927. — Schweizerisches Lebensmittelbuch, 3. Aufl. Bern: Neukomm & Zimmermann 1917. — A. L. WINTON: The structure and Composition of foods. Vol. 1. New York: J. Wiley & Sons. (Chapman & Hall, London) 1932.

<sup>1</sup> K. LINDENFELD: Roczniki Chem. 1933, 13, 57; C. 1933, I, 2438.

<sup>2</sup> Ist die Lösung in Salpetersäure trübe, so wird sie mit 5 ccm 25%iger Ammonnitratlösung verdünnt, filtriert und mit den restlichen 15 ccm Ammonnitratlösung und den 11 ccm Wasser ausgewaschen.

<sup>3</sup> E. ARBENZ: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1922, 13, 45; C. 1922, IV, 67.

<sup>4</sup> HEUBNER u. STADLER: Biochem. Zeitschr. 1914, 64, 422; C. 1914, II, 590.

<sup>5</sup> A. RIPPEL: Biochem. Zeitschr. 1920, 103, 163; C. 1920, IV, 67; Z. 1923, 45, 295.

# Alkohole.

Von

Professor **DR. A. BÖMER** und **DR. O. WINDHAUSEN**-Münster i. W.

Mit 4 Abbildungen.

In diesem Abschnitte sind nur der Nachweis und die Bestimmung der einwertigen gesättigten Alkohole der aliphatischen Reihe  $C_nH_{2n+1}\cdot OH$  bis zu den Amylalkoholen behandelt.

Über den Nachweis und die Bestimmung der höheren einwertigen Alkohole dieser Reihe, des zweiwertigen Alkohols Glykol und des dreiwertigen Alkohols Glycerin sowie der Sterine siehe Band IV dieses Handbuches.

Der Inhalt dieses Abschnittes ist so eingeteilt, daß im ersten Hauptteil die allgemeinen Methoden zum Nachweise und zur Bestimmung von alkoholischen OH-Gruppen behandelt werden, während in dem zweiten Hauptteil die für die einzelnen Alkohole eindeutigen Reaktionen und Bestimmungsmethoden Aufnahme gefunden haben.

## I. Allgemeines zum Nachweis und zur Bestimmung von Alkoholen.

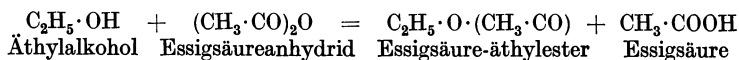
### A. Nachweis von alkoholischen OH-Gruppen.

#### 1. Esterbildung.

Die allgemeinste Reaktion zum Nachweis alkoholischer OH-Gruppen ist ihre Esterbildung. Die entstehenden Ester werden isoliert, auf ihre Schmelzpunkte untersucht oder durch Reaktionen nachgewiesen.

Die für analytische Zwecke wichtigsten Esterbildungen sind folgende:

a) **Essigsäureester.** Die Substanz wird mit der gleichen Menge von wasserfreiem Natriumacetat und der drei- bis vierfachen Menge Essigsäureanhydrid 10 Minuten bis mehrere Stunden — je nach Art und Menge des Alkohols — am Rückflußkühler auf 110—120° erhitzt.



Statt mit Essigsäureanhydrid kann die Veresterung auch mit Acetylchlorid für sich allein oder mit Zusätzen wie Pyridin oder Alkalicarbonat erfolgen.

b) **Benzoessäureester.** Man verwendet entweder die Benzoessäureester oder die p-Nitro- und 3,5-Dinitrobenzoessäureester, von denen sich die ersteren auch in geringen Mengen durch ihren charakteristischen „aromatischen“ Geruch bemerkbar machen und die letzteren durch ihre Krystalle mit gut definierten Schmelzpunkten ausgezeichnet sind.

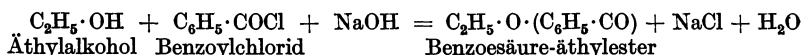
Nach A. BAUMANN<sup>1</sup> schüttelt man den Alkohol mit 10%iger Natronlauge und Benzoylchlorid oder p-Nitrobenzoylchlorid unter Kühlung bis unterhalb 25°.

<sup>1</sup> A. BAUMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1886, **19**, 3218.

Tabelle 1. Schmelzpunkte von

| Bezeichnung der Ester                       | Methylalkohol        | Äthylalkohol    | Propylalkohol      |                    |
|---|----------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
|   |                      |                 | Normal-            | Iso-               |
| p-Nitro-benzoessäureester (b)               | 67                   | 57              | —                  | 111                |
| 3,5-Dinitro-benzoessäureester               | 108<br>110—110,5 (e) | 93<br>93—94 (d) | 74<br>74—75 (b, d) | 123<br>121—122 (d) |
| Desgl. $\alpha$ -Naphthylaminverbindung     | 121—122 (e)          | 120—121 (e)     | 103—104 (e)        | 143—144 (e)        |
| p-Diphenyl-urethane (b, g)                  | 127                  | 119             | 129                | 138                |
| p-Jod-diphenyl-urethane                     | 191,1 (f)            | 200—200,5 (h)   | 188,7 (f, i)       | —                  |
| $\alpha$ -Naphthyl-urethane                 | 124 (e)              | 79 (e)          | 80 (e)             | 105—106 (e)        |
| p-Nitro-phenyl-urethane (f)                 | 179,5                | 129             | 115                | 116                |
| Anthrachinon- $\beta$ -carbonsäureester (e) | 167—168              | 147—148 (d)     | 115—116            | 140—141            |
| 3-Nitrophthalsäure-2-monoalkylester (a)     | 152—153              | 156—157         | 141—142            | 152—153            |
| p-Nitro-benzyl-phthalsäureester             | 105,7 (c)            | 80 (c)          | 53 (c)             | 74 (b)             |

Krystallisation: (a) aus Wasser, (b) aus Alkohol, (c) aus verdünntem Alkohol, (d) aus Petrol-



Statt mit Benzoylchlorid kann die Veresterung auch mit Benzoessäureanhydrid erfolgen; man erhitzt den Alkohol damit auf 150° und darüber.

Zur Darstellung der Ester der 3,5-Dinitro-benzoessäure gibt man nach T. REICHSTEIN<sup>1</sup> einige Tropfen des Alkohols zur Lösung des 3,5-Dinitro-benzoylchlorids in Benzol, fügt Pyridin hinzu, verdünnt nach einigem Stehen — bei tertiären Alkoholen nach halbstündigem Kochen — mit Äther und schüttelt die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure, verdünnter Natronlauge und Wasser. Der aus der ätherischen Lösung hinterbliebene Ester wird aus Ligroin, Petroläther oder Toluol umkrystallisiert.

Die Dinitroester geben mit  $\alpha$ -Naphthylamin orangefarbige bis rote, gut krystallisierende Molekülverbindungen (1 : 1), die auch als Farbreaktionen dienen können.

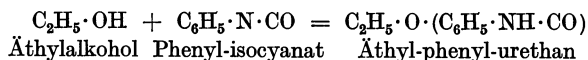
<sup>1</sup> T. REICHSTEIN: Helv. chim. Acta 1926, 9, 799; C. 1926, II, 2988. — Vgl. auch W. M. D. BRYANT: Journ. Amer. Chem. Soc. 1932, 54, 3758.

## Ester aliphatischer Alkohole.

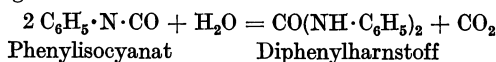
| Butylalkohol |                | Amylalkohol      |                 | Autor (Schrifttum)   |
|--------------|----------------|------------------|-----------------|--|
| Normal-      | Iso-           | Iso-<br>(primär) | aktiver (d)     |  |
| —            | —              | —                | —               | BUCHNER u. MEISENHEIMER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, 38, 620  |
| 64           | 87             | —                | —               | BRYANT: Journ. Amer. Chem. Soc. 1932, 54, 3758.  |
| 61—63 (b, e) | 87—88 (e)      | 61—62 (e)        | 70—70,5 (e)     | REICHSTEIN: Helv. chim. Acta 1926, 9, 799; C. 1926, II, 2988.  |
| 92,5—93 (d)  | 105,5—106,5(e) | 104—105 (e + h)  | 100—101 (e + h) | REICHSTEIN: Helv. chim. Acta 1926, 9, 799; C. 1926, II, 2988.  |
| 109          | —              | —                | —               | MORGAN u. PETTET: Journ. Chem. Soc. London 1931, 1124; C. 1931, II, 881.   |
| 173—174 (f)  | —              | —                | —               | KAWAI u. TAMURA: Scient. Papers Inst. physical. chem. Res. 1930, 13, 270; C. 1930, II, 1970.                     |
| 71—72 (e)    | 103—105 (e)    | 67—68 (c)        | 82 (e)          | NEUBERG u. KANSKY: Biochem. Zeitschr. 1909, 20, 445.<br>BICKEL u. FRENCH: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, 48, 747. |
| 95,5         | 80             | 97,5             | —               | SHRINER u. COX: Journ. Amer. Chem. Soc. 1931, 53, 1601.  |
| 122—123      | 121—122        | 88—89            | —               | REICHSTEIN: Helv. chim. Acta 1926, 9, 803; C. 1926, II, 2989.  |
| 146—147      | —              | 165—166          | 157—158         | NICOLET u. SACKS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1925, 47, 2348.  |
| 62 (b)       | —              | —                | —               | REID: Journ. Amer. Chem. Soc. 1917, 39, 1249; C. 1917, II, 705.  |

äther, (e) aus Ligroin, (f) aus Tetrachlorkohlenstoff, (g) aus Benzol, (h) aus Toluol, (i) aus Aceton.

c) Urethane (Carbaminsäureester).  $\alpha$ ) Phenylurethane werden erhalten, wenn man äquivalente Mengen Alkohol und Phenyl-isocyanat in der Siedehitze aufeinander einwirken läßt.



Bei Gegenwart von Wasser entsteht statt des Esters Diphenylharnstoff, was zu Täuschungen Anlaß geben kann.



Diphenylharnstoff bildet bei 235<sup>0</sup> schmelzende Krystalle, die in Äthylalkohol und Essigäther schwer löslich sind.

$\beta$ ) p-Diphenyl-urethane. Da das Isocyanat nach G. T. MORGAN und A. E. J. PETTET<sup>1</sup> häufig ölige Ester bildet, schlagen sie vor, das p-Diphenylisocyanat ( $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} \cdot \text{CO}$ ) zur Esterbildung zu verwenden.

<sup>1</sup> G. T. MORGAN u. A. E. J. PETTET: Journ. Chem. Soc. London 1931, 1124; C. 1931, II, 881.

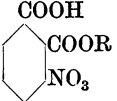
γ) p-Jod-diphenyl-urethane stellten S. KAWAI und K. TAMURA<sup>1</sup> durch einstündiges Kochen benzolischer Lösungen von je 1 Mol. Alkohol und p-Jod-diphenyl-isocyanat und Umkrystallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff dar.

δ) α-Naphthyl-urethane werden nach C. NEUBERG und E. KANSKY<sup>2</sup> erhalten durch Einwirkung von α-Naphthyl-isocyanat auf die Alkohole bei gelindem Erwärmen im Reagensglase mit kurzem Steigerrohr, wobei für völligen Ausschluß von Wasser Sorge zu tragen ist. Das Reaktionsprodukt wird mit heißem Ligroin ausgekocht, aus dessen Lösung sich die Ester krystallin ausscheiden. — In ähnlicher Weise stellten V. T. BICKEL und H. E. FRENCH<sup>3</sup> diese Ester dar.

ε) p-Nitro-phenyl-urethane sind wegen ihrer hohen Schmelzpunkte nach R. L. SHRINER und R. F. B. COX<sup>4</sup> besonders zur Identifizierung von Alkoholen geeignet. Sie stellten diese Urethane dar durch Zugabe der Alkohole zu einer Lösung von p-Nitro-phenyl-carbamylchlorid in Benzol, Abdestillieren, Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff und Norit, Filtrieren, Einengen und Krystallisation.

δ) Anthrachinon-β-carbonsäureester stellt man nach T. REICHSTEIN<sup>5</sup> dar, indem man den Alkohol mit dem Anthrachinon-β-carbonsäurechlorid<sup>6</sup> in Benzol + Äther + Pyridin längere Zeit stehen läßt oder ohne Äther kurz kocht, das Filtrat mit verdünnter Salzsäure wäscht, mit 1 ccm 50%iger Kalilauge durchschüttelt, die abgegossene Lösung mit 1 ccm frischer Kalilauge 15 Minuten schüttelt, aus dem Filtrat die Lösungsmittel entfernt und den Rückstand aus Petroläther oder Benzin umkrystallisiert.

ε) Phthalsäureester. α) 3-Nitrophthalsäure-2-monoalkylester nebenstehender Konstitution bilden sich nach B. H. NICOLET und J. SACKS<sup>7</sup> durch



5—10 Minuten langes Erhitzen der Alkohole mit der doppelten Gewichtsmenge von 3-Nitrophthalsäureanhydrid, bis das Gemisch flüssig wird. Das Reaktionsprodukt wird aus heißem Wasser umkrystallisiert. Liegt ein wasserhaltiger Alkohol vor, so salzt man vorher mit Kaliumcarbonat aus und verwendet die alkoholische Schicht zur Untersuchung.

Da die Monoester noch eine freie Carboxylgruppe enthalten, läßt sich das Äquivalentgewicht unbekannter Alkohole leicht durch Titration bestimmen; der nur in geringer Menge entstehende isomere Alkylester wird durch das Umkrystallisieren entfernt.

Löslichkeit: In 100 ccm Wasser lösen sich bei 20°:

| Methyl- | Äthyl- | n-Propyl- | i-Propyl- | n-Butyl- | i-Butyl- | i-Amylester |
|---------|--------|-----------|-----------|----------|----------|-------------|
| 0,185   | 0,290  | 0,114     | 0,082     | 0,051    | 0,024    | 0,024 g     |

β) p-Nitrobenzyl-phthalsäureester erhält man nach E. E. REID<sup>8</sup> durch Erhitzen der Natriumsalze der nach α) erhaltenen Monoester mit p-Nitrobenzylbromid. Das Verfahren eignet sich namentlich zum Nachweis von Methylalkohol in Äthylalkohol.

<sup>1</sup> S. KAWAI u. K. TAMURA: Scient. Papers Inst. physical. chem. Res. 1930, **13**, 270; C. 1930, II, 1970.

<sup>2</sup> C. NEUBERG u. E. KANSKY: Biochem. Zeitschr. 1909, **20**, 445.

<sup>3</sup> V. T. BICKEL u. H. E. FRENCH: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, **48**, 747.

<sup>4</sup> R. L. SHRINER u. R. F. B. COX: Journ. Amer. Chem. Soc. 1931, **53**, 1601; C. 1931, I, 3346.

<sup>5</sup> T. REICHSTEIN: Helv. chim. Acta 1926, **9**, 803; C. 1926, II, 2989.

<sup>6</sup> Die Darstellung der Anthrachinon-β-carbonsäure geschieht nach G. HELLER u. K. SCHÜLKE (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, **41**, 3627), die des Chlorides mit Phosphor-pentachlorid in Phosphoroxychlorid; vgl. dazu T. REICHSTEIN (Fußnote 5).

<sup>7</sup> B. H. NICOLET u. J. SACKS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1925, **47**, 2348.

<sup>8</sup> E. E. REID: Journ. Amer. Chem. Soc. 1917, **39**, 1249; C. 1917, II, 705.

## Schmelzpunkte der Ester.

Die Schmelzpunkte der nach den vorstehenden Verfahren dargestellten Ester sind in der Tabelle I auf S. 978 u. 979 zusammengestellt.

## 2. Farbenreaktionen.

Zum Nachweis von Alkoholen ist eine Reihe von Farbenreaktionen vorgeschlagen. Bei ihrer Anwendung ist aber insofern Vorsicht geboten, als außer den Alkoholen auch andere Stoffe unter Umständen ähnliche Farbreaktionen geben können. Bei Flüssigkeiten, welche solche Stoffe enthalten, destilliert man daher die Alkohole zunächst ab und prüft die Destillate.

**a) Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure nach L. Rosenthaler<sup>1</sup>.** Als Reagens verwendet man eine unter Kühlung bereitete Mischung von 1 Tl. einer 0,7%igen Natriumnitritlösung und 4 Tln. einer Lösung von 1 g Sulfanilsäure in 150 g Wasser und 50 g 5 N.-Salzsäure.

Ausführung der Reaktion. Zu dem Reagens setzt man in einem Reagensglase den Alkohol, macht mit einem Überschuß von Natron- oder Kalilauge alkalisch und erwärmt einige Minuten im Wasserbade; in der Kälte tritt die Reaktion sehr langsam ein. Die Färbung nimmt nach einiger Zeit ab und verschwindet schließlich ganz. Die Empfindlichkeit ist keine übermäßig große; 2,5 mg Äthylalkohol waren aber noch nachweisbar.

Die entstehende Färbung ist bei

Methyl- und Äthylalkohol: himbeerrot.

Propyl- und i-Propylalkohol: gelbrot und schwächer als bei den vorstehenden,

Butylalkohol: rot, stärker als bei i-Propylalkohol,

Amylalkohol: hellrosa,

Äthylenglykol, Glycerin, Erythrit, Mannit, Dulcitol und Inositol: stark himbeerrot.

Milch-, Apfel-, Wein- und Citronensäure geben ähnliche Reaktionen.

**b) Reaktionen mit aromatischen Aldehyden.** Aromatische Aldehyde (Salicyl-, Anis-, Zimtaldehyd, Protocatechualdehyd<sup>2</sup>, Vanillin, Piperonal) und Furfural geben bei Gegenwart von konz. Schwefelsäure mit Alkoholen charakteristische Farbenreaktionen. A. KOMAROWSKI<sup>3</sup>, T. TAKAHASHI<sup>4</sup>, L. EKKERT<sup>5</sup>, O. NOETZEL<sup>6</sup> haben sich in neuerer Zeit eingehend mit diesen Reaktionen beschäftigt. Als Ergebnis dieser Arbeiten ist hervorzuheben, daß die mit den genannten Aldehyden eintretenden Farbenreaktionen nicht zur Unterscheidung der Alkohole geeignet sind, sondern lediglich zum Nachweis der höheren Alkohole (Propyl-, Butyl-, Amylalkohol) in Äthylalkohol dienen können.

T. TAKAHASHI löst 1 g Vanillin in 200 ccm Schwefelsäure ( $D = 1,84$ ), mischt 2 ccm dieser Lösung mit dem zu untersuchenden Alkohol und setzt dann tropfenweise Wasser hinzu. Es entstehen dann ohne Wasser und nach tropfenweisem Wasserzusatz folgende Färbungen:

Methylalkohol (1 Tropfen): dunkelrot (20 Tropfen Wasser),

Äthylalkohol (1 ccm): gelb, tief grünblau, hellgrün,

n-Propylalkohol (1 Tropfen): purpurrot, tiefrot, purpurblau,

i-Propylalkohol (1 Tropfen): gelb, tief rot, tief purpurrot,

n-Butylalkohol (1 Tropfen): tief gelb, purpurn (14 Tropfen Wasser),

Amylalkohol (0,5 ccm 0,1%ige Lösung in 15%igem Äthylalkohol): tief rot, trübe werdend, dann klar purpurn.

L. EKKERT mischt in einem Reagensrohr je 2 Tropfen der Alkohole (n-Propyl-, i-Propyl-, n-Butyl-, i-Butyl- und Amylalkohol), 2 ccm 96%igen Äthylalkohol und je 4 Tropfen der Aldehydlösung (Vanillin, Piperonal, Anis-, Salicyl-, Zimtaldehyd) bzw. Furfural und unterschichtet die Flüssigkeit mit 2 ccm konz. Schwefelsäure. Es entsteht ein lebhaft gefärbter Farbenring, der bei vorsichtigem Schwenken breiter wird und auch die überstehende alkoholische Schicht lebhaft färbt. Es treten bei den genannten Alkoholen und Aldehyden gelbe, grüne, rote, violette und braune Farbenringe und Übergänge dieser Farben auf, die aber nach O. NOETZEL nicht zur Unterscheidung der genannten Alkohole, sondern nur zu dem Nachweis geeignet sind, ob in einem Äthylalkohol überhaupt höhere Alkohole vorhanden sind.

<sup>1</sup> L. ROSENTHALER: Chem.-Ztg. 1912, **36**, 830; auch L. ROSENTHALER: Der Nachweis organischer Verbindungen, S. 49. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

<sup>2</sup> L. ROSENTHALER: Pharm. Ztg. 1931, **76**, 775.

<sup>3</sup> A. KOMAROWSKI: Chem.-Ztg. 1903, **27**, 807.

<sup>4</sup> T. TAKAHASHI: Journ. Agricult. Tokyo 1913, **5** (2), 167; Z. 1914, **27**, 820.

<sup>5</sup> L. EKKERT: Pharm. Zentralh. 1928, **69**, 289.

<sup>6</sup> O. NOETZEL: Z. 1932, **64**, 288.

c) **Reaktion einwertiger Alkohole nach B. v. Bittó<sup>1</sup>.** Einwertige Alkohole können mittels einer Lösung von 50 mg Methylviolett in 100 ccm Wasser nachgewiesen werden. Zur Prüfung fügt man 1—2 ccm dieser Lösung zu der zu untersuchenden Flüssigkeit, setzt 0,5—1 ccm einer Alkalipolysulfidlösung hinzu und schüttelt gut um.

Bei Gegenwart von Methyl-, Äthyl-, n- und i-Propylalkohol wird die Flüssigkeit kirschrot und bei Gegenwart von tertiärem und i-Butylalkohol und i-Butylcarbinol violettrot gefärbt und bleibt klar. Die Färbungen erleiden bei längerem Stehen Veränderungen. Die Reaktion gelingt am besten bei Anwendung etwas größerer Substanzmengen. Sie ist nicht sehr empfindlich, dagegen charakteristisch. Sind keine einwertigen Alkohole zugegen, so nimmt die Lösung eine grünlichblaue Farbe an, aus der sich nach einiger Zeit rötlich-violette Flocken abscheiden, während die Flüssigkeit gelb wird. Zwei- und mehrwertige Alkohole, Kohlenhydrate, Säuren, aromatische Verbindungen, Phenole usw. geben diese Reaktion nicht.

d) **Nachweis von n-Propyl- und n-Butylalkohol nach H. H. Weber und W. Koch<sup>2</sup>.** 1 ccm des zu untersuchenden Alkohols wird mit 2—8 Tropfen BECKMANN'Scher Mischung (50 g Kaliumdichromat, 28 ccm konz. Schwefelsäure und 300 ccm Wasser) durch kurzes Erhitzen bis zum Sieden oxydiert, abgekühlt und zentrifugiert oder durch Absetzenlassen geklärt. In ein kleines Reagensglas (9 cm lang, 0,8 cm weit) werden einige Körnchen o-Nitrobenzaldehyd und ein Teil des oxydierten Alkohols sowie die doppelte bis dreifache Menge 2 N.-Natronlauge gegeben. Man schüttelt etwa  $\frac{1}{2}$  Minute. Es zeigen sich, teils schon beim Schütteln, teils erst beim Stehen folgende Farbabläufe bei den einzelnen Alkoholen:

## Farbenfolge.

| Methylalkohol | Äthylalkohol                              | n-Propylalkohol  | i-Propylalkohol   | n-Butylalkohol   | i-Butylalkohol   | i-Amylalkohol |
|---------------|---|--|---|--|--|---------------|
| grün          | grün<br>gelb<br>braungelb<br>bis braunrot | violett<br>weinrot<br>o. Sch.: schwarzrot<br>dann rot<br>u. Sch.: rotbraun | grün<br>gelb<br>braunrot<br>gelb mit<br>blauen<br>Flocken | nach öfterem<br>Schütteln sich<br>langsam färbend<br>o. Sch.: rot<br>u. Sch.: violett<br>bis stahlblau | farblos<br>erst nach<br>vieltündigem<br>Stehen<br>o. Sch.: gelb-<br>grün<br>u. Sch.: orange-<br>gelb |               |

## Grenzkonzentration der Nachweisbarkeit.

|                    |     |   |     |      |      |
|--------------------|-----|---|-----|------|------|
| In n-Propylalkohol | —   | — | —   | 2,5% | 2,5% |
| n-Butylalkohol     | —   | — | —   | 2,5% | 2,5% |
| i-Butylalkohol     | 20% | — | 10% | —    | 5%   |
| i-Amylalkohol      | 20% | — | 5%  | 2,5% | —    |

Nach Schichtenbildung bedeutet: o. Sch. = obere und u. Sch. = untere Schicht.

Das Verfahren ist namentlich zum Nachweis von n-Propyl- und n-Butylalkohol geeignet.

Zum Nachweis des i-Butylalkohols nimmt man anstatt o-Nitrobenzaldehyd p-Nitrobenzoylchlorid, welches eine tief violette Färbung gibt, während die übrigen Alkohole mit diesem Reagens nur schwache und andere Färbungen geben. Man löst 0,2 g p-Nitrobenzoylchlorid in 10 ccm 2 N.-Natronlauge in der Hitze, versetzt den durch 10 Tropfen BECKMANN'Scher Lösung auf je 1 ccm oxydierten Alkohol mit der doppelten bis dreifachen Menge dieser Lösung und erhitzt  $\frac{1}{2}$  Minute zum Sieden. Es entsteht über einen braunen Ton eine tief violette Färbung. Die übrigen Alkohole zeigen keine Veränderungen oder gelbliche und grünliche Farbentöne. — i-Amylalkohol kann mit Piperonal nachgewiesen werden: 0,5 ccm 25%ige Salzsäure werden zum Sieden erhitzt, mit 0,5 ccm der zu untersuchenden Lösung überschichtet und eine Messerspitze Piperonal dazugegeben. Nach 5 Minuten langem Stehen wird vorsichtig gekocht. Ist i-Amylalkohol vorhanden, so färbt sich die Lösung blau, während die Homologen sich nur gelblich färben. Reinsten i-Amylalkohol zeigt die Färbung nur schwach. Verwendet man aber statt der Salzsäure 50%ige Schwefelsäure, so tritt die Färbung auch hier in genügender Stärke auf.

<sup>1</sup> B. v. BITTÓ: Chem.-Ztg. 1893, 17, 611.

<sup>2</sup> H. H. WEBER u. W. KOCH: Chem.-Ztg. 1933, 57, 73.

e) **Nachweis von n- und i-Butylalkohol und i-Amylalkohol nach H. Weber<sup>1</sup>.** Das Verfahren beruht auf der bekannten<sup>2</sup> Eigenschaft von Kobaltrhodanverbindungen, in Alkohole und einige andere organischen Verbindungen mit blauer Farbe überzugehen.

Reagens. 10 ccm einer aus 12,5 Tln. Ammoniumrhodanat und 10 Tln. Wasser bestehenden Ammoniumrhodanatlösung werden mit 2 ccm einer 5%igen Kobaltnitratlösung und 24 ccm Wasser versetzt. Man erhält eine Lösung, die durch das gebildete Ammonium-Kobaltrhodanat blaviolett gefärbt ist.

Ausführung der Prüfung. Man mischt die Probe mit dem Reagens im Verhältnis 1 : 2 und schüttelt durch. Je nach der Art des vorhandenen Alkohols treten dabei folgende Erscheinungen auf:

n-Butylalkohol. Einheitliche blaue Lösung; beim Verdünnen mit Wasser tritt Entmischung ein: obere Schicht blau, untere Schicht farblos (Unterschied von den niederen Alkoholen, die sich hierbei nicht entmischen).

i-Butylalkohol. Obere Schicht blau, untere Schicht grünblau; verdünnt man die Flüssigkeit mit dem Reagens bis zum Verhältnis 1 : 6, so verschwindet die Trennungslinie, und man erhält eine einheitliche blaue Lösung. Setzt man Wasser bis zum Umschlag der Farbe in Rosa hinzu, so tritt keine Entmischung ein.

i-Amylalkohol. Obere Schicht blau, untere Schicht farblos.

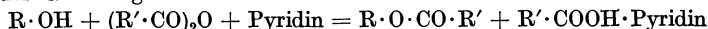
## B. Bestimmung von Alkoholen.

In diesem Abschnitt werden Methoden behandelt, welche auf allgemeinen Reaktionen der alkoholischen OH-Gruppen beruhen und, sofern nur ein Alkohol in der zu untersuchenden Lösung vorhanden ist, daher auch zu dessen Bestimmung dienen können. Sie beruhen teils auf der Veresterung der Alkohole, teils auf der Überführung in die Jodalkyle, teils auf der Oxydation der Alkohole.

### 1. Veresterung mit Essigsäureanhydrid nach A. VERLEY und FR. BÖLSING<sup>3</sup>.

Das Verfahren beruht auf der quantitativen Veresterung der Alkohole mit Essigsäureanhydrid unter Zusatz von Pyridin. Man verwendet eine Mischung von etwa 120 g Essigsäureanhydrid und etwa 880 g Pyridin.

Nach der Gleichung



kombiniert sich das freiwerdende Halbmolekül Anhydrid sofort mit dem Pyridin zu einem neutralen Salz, so daß die Möglichkeit der Wiederverseifung des gebildeten Esters fehlt.

Die Methode kann zur Bestimmung der verschiedensten Alkohole und Phenole dienen. Essigsäureanhydrid und Pyridin wirken bei Verwendung wasserfreier Stoffe nicht aufeinander ein, bei Zusatz von Wasser dagegen wird das Essigsäureanhydrid sofort verseift unter Bildung von Pyridinacetat, welches seinerseits durch Alkali in Alkaliacetat und Pyridin zerfällt.

Ausführung der Bestimmung. In einem Kölbchen von etwa 200 ccm Inhalt wägt man 1—2 g der alkoholhaltigen Flüssigkeit ab, fügt 25 ccm der Essigsäureanhydrid-Pyridinmischung hinzu und erwärmt ohne Kühler  $\frac{1}{4}$  Stunde im Wasserbade. Nach dem Erkalten versetzt man mit etwa 25 ccm Wasser und titriert unter Benutzung von Phenolphthalein als Indicator die nicht gebundene Essigsäure mit N.- oder 0,5 N.-Natronlauge zurück. Dabei ist darauf zu achten, daß die Titration der Lösung bei der Untersuchung und beim Leerversuch mit der Essigsäureanhydrid-Pyridinmischung (25 ccm) bei genau gleicher Temperatur erfolgt. 1 ccm N.-Lauge entspricht 0,032 g Methyl- und 0,046 g Äthylalkohol.

H. OLDEKOP<sup>4</sup> hat das folgende Verfahren für die Bestimmung des Methylalkohols in Vergällungsholzgeist ausgearbeitet, das von der deutschen Zoll-

<sup>1</sup> H. WEBER: Chem.-Ztg. 1930, 54, 61.

<sup>2</sup> MORELL: Zeitschr. analyt. Chem. 1877, 16, 251 u. AZZARELLO: Süddtsch. Apoth.-Ztg. 1909, 49, 115.

<sup>3</sup> A. VERLEY u. FR. BÖLSING: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1901, 34, 3354.

<sup>4</sup> H. OLDEKOP: Z. 1913, 26, 129.



verwaltung vorgeschrieben ist. In einen 250 ccm fassenden Kolben mit Rückflußrohr werden 50 ccm eines Gemisches von 120 Gew.-Thn. Essigsäureanhydrid und 880 Thn. gereinigtem Pyridin gegeben. Diesem Gemisch wird von dem zu untersuchenden Holzgeist in einem Wägeröhrchen eine genau abgewogene Menge von etwa 1,250 g zugesetzt. Der Kolben mit Inhalt wird bis zum Hals in lebhaft siedendes Wasser gestellt, dort 30 Minuten gelassen und dann abgekühlt. Der erkaltete Kolbeninhalt wird mit 50 ccm Wasser vermischt, abermals abgekühlt und nach Zugabe von ein wenig Phenolphthalein mit N.-Natron- oder -Kalilauge titriert, bis die Flüssigkeitsmenge in ihrer Gesamtheit vorübergehend rötlich gefärbt erscheint. Die Hauptmenge der Lauge ist mittels Pipette zuzusetzen, der Rest mittels Bürette. Der Zufluß der Lauge aus der Bürette ist so zu regeln, daß er binnen einer Minute beendet ist; die Wärme der Flüssigkeit soll 15—20° betragen. Der Wirkungswert von 50 ccm des Gemisches von Essigsäureanhydrid und Pyridin gegenüber N.-Lauge wird in gleicher Weise durch einen Leer-versuch ermittelt.

Zu beachten ist bei dieser Bestimmung folgendes:

1. Die Pyridin-Essigsäureanhydridmischung muß in der angegebenen Menge angewendet werden, da bei geringeren Mengen eine vollständige Veresterung nicht stattfindet und zu niedrige Werte erhalten werden.

2. Das Wasserbad muß lebhaft sieden und das Kölbchen muß tatsächlich bis zum Halse darin stehen. Ein Erhitzen auf dem Wasserbade genügt keinesfalls.

3. Die Titration muß so schnell wie möglich erfolgen, namentlich gegen Ende, da sonst ein Teil des gebildeten Essigsäuremethylesters wieder verseift wird, wodurch für den Methylalkoholgehalt zu geringe Werte erhalten würden. Aus diesem Grunde soll die Hauptmenge der zum Zurücktitrieren der unverbrauchten Säure erforderlichen N.-Alkalilauge vor Eröffnung des eigentlichen Titrierens mit einer Pipette zugegeben werden. Der Endpunkt der Titration ist erreicht, sobald die Rosafärbung in der Gesamtmenge der Flüssigkeit einen Augenblick bestehen bleibt.

4. Das Verfahren liefert genaue Ergebnisse nur bis zu einer Konzentration von etwa 30% Methylalkohol. Bei geringeren Konzentrationen ist es notwendig, das Wasser aus dem Methylalkohol-Wasserdampfgemisch zu entfernen, bevor dieses mit dem Veresterungsgemisch zusammenkommt.

## 2. Veresterung mit Ameisensäure nach J. WIMMER<sup>1</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Veresterung der Alkohole (Methyl- und Äthylalkohol) durch Ameisensäure und Trennung der Ester durch Fraktionierung. Eine Untersuchung dauert etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde.

Ausführung der Bestimmung. In einem 250 ccm-Kolben werden zu dem zu untersuchenden wäßrigen Alkohol die vier- bis achtfache Menge der nach der Theorie zur Veresterung erforderlichen Ameisensäure und als Veresterungskatalysator 0,5 ccm konz. Schwefelsäure gegeben. Der Kolben wird mit einem Destillationsaufsatz verbunden, der im unteren Teil mit Glasperlen gefüllt ist und im oberen einen Dephlegmator enthält. Durch die zweite Durchbohrung des Stopfens führt ein feines Capillarrohr zum Durchleiten von indifferentem Gas durch den Kolben. An das Ansatzrohr der Kolonne wird direkt ein mit N. Lauge beschicktes PÉLIGOT-Rohr angeschlossen. Das Veresterungsgemisch wird  $\frac{1}{4}$  Stunde lang in mäßigem Tempo fraktioniert. Beträgt der Methylalkoholgehalt der wäßrigen Mischung etwa 10—15%, so liegt die Destillationstemperatur bei etwa 40° (für Äthylalkohol bei 70°), bei geringeren Gehalten bis zu 1—2% bei etwa 50°. Es ist erforderlich, die letzten Reste von Ester durch Einleiten eines indifferenten Gases durch das Capillarrohr überzutreiben. Man leitet während 10 Minuten einen Gasstrom mit einer Geschwindigkeit von etwa 2—3 Blasen in der Sekunde durch die Flüssigkeit. Der Ester

<sup>1</sup> J. WIMMER: Zeitschr. angew. Chem. 1925, 38, 721.

wird in der vorgelegten Lauge sofort verseift. Der Gehalt an Alkohol berechnet sich aus dem für die äquivalente Säuremenge erforderlichen Laugenverbrauch.

Die Ergebnisse fallen bei einer Alkoholkonzentration von 12—15% um etwa 5%, bezogen auf den absoluten Alkohol, zu niedrig aus; bei noch niedrigeren Konzentrationen sind die Verluste entsprechend größer.

Die Gegenwart von Aceton wirkt nicht störend, da dieses in der Kälte von der N.-Lauge praktisch nicht verändert wird. Auch bei Anwesenheit von Formaldehyd ist die Methode anwendbar, nur ist zu empfehlen, dann die Vorlage mit Eis zu kühlen und das Nachspülen mit Gas zu unterlassen. Der Formaldehydgehalt bewirkt eine Erhöhung des theoretischen Wertes um etwa 3%.

### 3. Veresterung mit Salpetriger Säure.

Nach diesem Verfahren können kleine Mengen von Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butyl- und Amylalkohol bestimmt werden. Äther, Aldehyde, Ketone, Carbon-säuren, Oxsäuren, Aminosäuren und Ester stören bei der Bestimmung nicht und Zucker nur wenig.

Das Prinzip der Methode ist folgendes: Setzt man zu einer, auch der verdünntesten alkoholhaltigen Lösung Natriumnitrit hinzu, so bildet sich nach dem Ansäuern sofort Alkylnitrit. Beim Verseifen dieses Esters mit saurer Kaliumjodidlösung wird eine der freiwerdenden Salpetrigen Säure entsprechende Menge Jod frei, die mit Thiosulfatlösung titrimetrisch bestimmt wird.

W. M. FISCHER und A. SCHMIDT<sup>1</sup> bedienen sich hierbei der Leichtflüchtigkeit der Ester der niederen Glieder der aliphatischen Alkohole und legen der Bestimmung die oxydierenden Eigenschaften der Salpetrigen Säure zugrunde, während W. PONNDORF<sup>2</sup> die Alkylnitrite aus der wäßrigen Lösung mit Tetrachlorkohlenstoff ausschüttelt und die reduzierenden Eigenschaften der Salpetrigen Säure der titrimetrischen Bestimmung zugrunde legt. Hierdurch wird die Bildung von Stickoxyd vermieden und bedarf es nicht der Ausschaltung des Luft-sauerstoffs. Ferner ist die Apparatur erheblich einfacher und die Ausführungszeit wesentlich kürzer, die erzielbare Genauigkeit größer und auch die Anwendungsbreite eine etwas größere (Methylalkohol bis Hexylalkohol, Benzylalkohol).

a) Destillationsverfahren von W. M. FISCHER und A. SCHMIDT<sup>1</sup>. Infolge des niedrigen Siedepunktes der in Frage kommenden Alkylnitrite (Methylnitrit — 12°, Äthylnitrit 17°, Isobutylnitrit 95—99°) lassen sie sich bei Zimmertemperatur durch die Kohlensäure in die Absorptionsflüssigkeiten übertreiben.

Apparatur (Abb. 1): Das 150—200 ccm fassende Entwicklungsgefäß *A* ist mit einem dreifach durchbohrten, mit Paraffin vergossenen Gummistopfen verschlossen, durch dessen Bohrung ein Zuleitungsrohr *a* für die Kohlensäure, die zweite ein kleiner Scheidetrichter *B* (100—150 ccm) und die dritte ein Gasableitungsrohr *b* mit einer mit Glaswolle gefüllten Kugel geht. An *b* schließt sich ein Vierkugelapparat *C* mit konz. Natriumbicarbonatlösung und an diesen ein Zehnkugelapparat *D* als Absorptions- und Verseifungsgefäß von etwa 60 ccm Inhalt. An diesen schließt sich ein mit etwas Glaswolle gefüllter Vorstoß *E* an, auf den durch einen Gummistopfen ein kleiner Tropftrichter *F* zum Einfüllen der Lösung aufgesetzt ist. Mit dem Vorstoß *E* ist ferner ein zur Hälfte mit Glasperlen gefüllter Tropftrichter *H* mit einem Scheidetrichter *G* verbunden, welcher zur Absorption der letzten Spuren des Alkylnitrits dient. Den Abschluß bildet eine an *G* angeschlossene Saugflasche *J*.

Ausführung der Bestimmung. Zwecks Bestimmung des Alkohols in einer wäßrigen Flüssigkeit wird durch Einleiten von Kohlensäure die Luft aus dem Apparat verdrängt; dann werden durch den Tropftrichter *B* 10 ccm

<sup>1</sup> W. M. FISCHER u. A. SCHMIDT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1924, 57, 693 u. 1926, 59, 679.

<sup>2</sup> W. PONNDORF: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 401.

gesättigte Natriumnitritlösung und ein bestimmtes Volumen der zu untersuchenden neutralen Flüssigkeit in das Entwicklungsgefäß *A* gegeben und der Trichter mit etwas Wasser nachgespült. Durch den Trichter *F* wird dann der Zehn-Kugel-Apparat mit einer Lösung von 4 g Kaliumjodid in 30 ccm Wasser und 10 ccm Salzsäure (1,18) gefüllt. In den Kontrollapparat *G* wird eine Lösung von 1 g Kaliumjodid in 20 ccm Wasser nebst einigen Tropfen Salzsäure eingefüllt. Nach Verdrängung der Luft aus dem Apparat durch die Kohlensäure gibt man durch den Tropftrichter *B* 20 ccm 25%ige Essigsäure in das Entwicklungsgefäß *A*, wobei stets ein lebhafter Kohlensäurestrom (etwa 1,5—2,0 Liter je Stunde) den Apparat passiert. Es beginnt kurz nach Zutritt der Säure eine sehr lebhaft Gasentwicklung, und die farblose Lösung im Zehn-Kugel-Apparat *D* beginnt sich gelb und dann braun zu färben. Die Hauptmenge

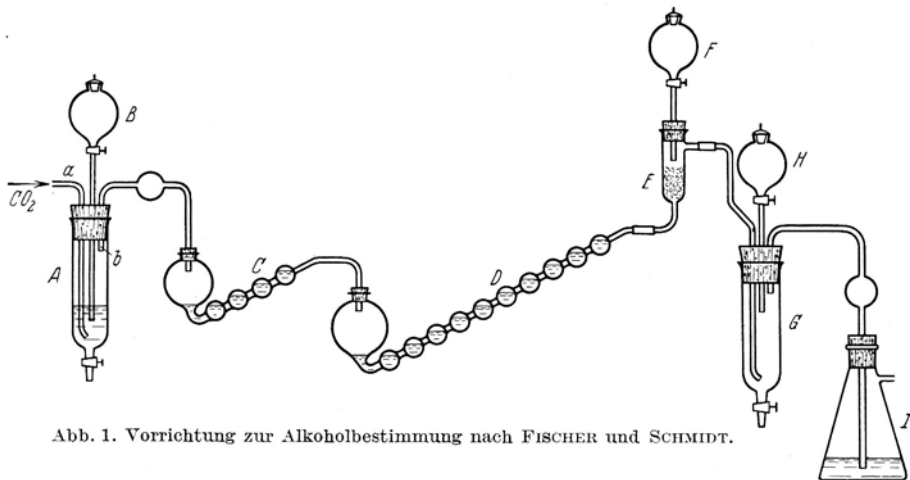


Abb. 1. Vorrichtung zur Alkoholbestimmung nach FISCHER und SCHMIDT.

des zu untersuchenden Alkohols ist nach etwa 1 Stunde vom Beginn des Säurezusatzes an, in das Absorptionsgefäß *D* übergegangen; es dauert aber noch weitere 1—1½ Stunden bis auch die letzten Reste des Alkohols entfernt werden. Kommt es jedoch nicht auf absolute Genauigkeit an, sondern handelt es sich nur um eine solche von 98—99% des Wertes, so kann die Bestimmung auf  $\frac{3}{4}$  bis 1 Stunde abgekürzt werden. Nach dieser Zeit wird, ohne den Kohlensäurestrom zu unterbrechen, die Flüssigkeit aus dem Entwicklungsgefäß *A* herausgelassen und nach etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde der Inhalt des Zehn-Kugel-Apparates *D* und des Kontrollgefäßes *G* in eine untergestellte Stöpselflasche entleert, mit ausgekochtem Wasser gut nachgespült und das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung titriert. Ein Leerversuch ist auszuführen und sein Verbrauch an Thiosulfatlösung — etwa 0,1 ccm bei dreistündiger Arbeitszeit — in Abzug zu bringen.

1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung entspricht 3,20 mg Methyl-, 4,60 mg Äthyl- und 6,01 mg Propylalkohol. Die Methode soll bei Methylalkohol bis auf 0,2 bis 0,3% und bei Äthylalkohol bis auf 0,1—0,4% des Gehaltes genaue Werte liefern.

Das Verfahren kann auch bei entsprechender Verkleinerung der Apparatur zur mikroanalytischen Bestimmung verwendet werden.

Nach W. PONNDORF<sup>1</sup> enthält die Methode von FISCHER und SCHMIDT einige Fehlerquellen, welche die Ergebnisse höher erscheinen lassen, als sie tatsächlich durch Alkylnitrit bewirkt werden. Die Werte, die nach Ausschaltung dieser Fehlerquellen erhalten werden, liegen zu tief, so daß man ohne Anwendung von Erfahrungsfaktoren nur dann theoretische

<sup>1</sup> W. PONNDORF: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 400—430.

Werte erzielt, wenn sich positive und negative Fehler überdecken. Eine Genauigkeit von 99,7—99,8% des Gehaltes zu erzielen, hält PONNDORF nicht für möglich.

Zur Behebung der Fehlerquellen macht PONNDORF folgende Vorschläge: Zur Erzielung einer Kohlensäure, die frei von Sauerstoff und Salzsäure ist, bedient er sich eines sehr komplizierten Apparates, der aus wäßriger Natriumcarbonatlösung, der durch Zusatz sauerstoffbindender Mittel der physikalisch gelöste Luftsauerstoff entzogen ist, die Kohlensäure in automatischer Weise freimacht. Im einzelnen sei auf die Originalarbeit verwiesen. Zur vollständigen Füllung des Apparates von FISCHER und SCHMIDT mit dieser Kohlensäure hat PONNDORF daran ein System von Gummileitungen angebracht, dessen Handhabung nicht einfach ist und die Einfüllung der Reaktionslösungen wesentlich erschwert. Ferner schlägt PONNDORF vor, zur Bindung der nitrosen Gase statt der 20 ccm konz. Natriumbicarbonatlösung eine solche mit 0,5 g Natriumnitrit zu verwenden und zwischen Kohlensäureentwicklungsapparat und Zersetzungsapparat zur Regulierung des Gasstromes ein Reagensglas mit Capillare einzuschalten.

Durch diese Abänderungen wird die Methode von FISCHER und SCHMIDT sehr erschwert, ohne daß dabei die Ergebnisse wesentlich verbessert werden, auch dürften die gerügten Mängel der Methode durch den vorgeschriebenen Leerversuch größtenteils beseitigt werden.

#### b) Ausschüttelungsverfahren von W. PONNDORF<sup>1</sup>.

Erforderliche Apparatur: Zwei Scheidetrichter von 150 (I) und 120 ccm Inhalt (II) mit etwa 20 cm langen Ablaufrohren können mittels Gummistopfen mit je einem Reagensglase, die an einem Titrierstativ befestigt sind, so verbunden werden, daß die Ablaufrohre etwa 1 cm über dem Boden der Reagensgläser endigen. Ferner ist eine enghalsige Schüttelflasche mit Glasstopfen aus starkem Glase von 250 ccm Inhalt erforderlich, die beim Schütteln durch Überziehen eines breiten Gummibandes über Stopfen und Flaschenboden gesichert werden kann.

Ausführung der Bestimmung. Zunächst werden die beiden Reagenrohre mit je 5 ccm Tetrachlorkohlenstoff beschickt. In den Scheidetrichter I gibt man darauf 40 ccm Tetrachlorkohlenstoff, 20 ccm — bei geringeren Mengen ergänzt man mit Wasser auf dieses Volumen — der zu untersuchenden alkoholhaltigen Lösung, 2,75 ccm Natriumnitritlösung (30 g Natriumnitrit + 70 g Wasser) und 5 ccm 7,5%ige Salzsäure. Darauf wird sofort der angefeuchtete Stopfen aufgesetzt und der Inhalt  $\frac{1}{2}$  Minute geschüttelt. Hierauf wird der Stopfen gelüftet und der Tetrachlorkohlenstoff in den Scheidetrichter II, in dem sich 40 ccm einer Lösung von Natriumbicarbonat-Natriumnitrit (50 g Natriumbicarbonat und 4 g Natriumnitrit im Liter Wasser enthaltend) befinden, abgelassen und  $\frac{1}{4}$  Minute geschüttelt. Nach klarem Absitzen des Tetrachlorkohlenstoffs im Scheidetrichter II läßt man ihn in die Schüttelflasche ab, in der sich 20 ccm Wasser befinden. Diese Ausschüttelungen werden noch zweimal wiederholt, das erste Mal mit 30, das zweite Mal mit 20 ccm Tetrachlorkohlenstoff. Darauf schüttelt man den Scheidetrichter I noch mit den 5 ccm Tetrachlorkohlenstoff im Reagensglas I aus und läßt diese nach dem klaren Absitzen zu den noch in Scheidetrichter II befindlichen 20 ccm Tetrachlorkohlenstoff fließen, schüttelt um und läßt nach dem klaren Absitzen in die Schüttelflasche fließen. Mit den 5 ccm Tetrachlorkohlenstoff im Reagensglas II schüttelt man darauf nochmals den Inhalt in dem Scheidetrichter II aus und gibt den klar abgesetzten Tetrachlorkohlenstoff dann auch in die Schüttelflasche.

In letztere gibt man darauf zunächst von einer 20%igen Mangansulfatlösung in N.-Schwefelsäure  $\frac{1}{5}$  der Anzahl Kubikzentimeter 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung, die erforderlich sind, damit mindestens 5 ccm von letzterer im Überschuß bleiben, und darauf noch 20 ccm N.-Schwefelsäure. Darauf schüttelt man den Inhalt der Flasche 10 Minuten intensiv durch, gibt 4 g Kaliumjodid, in 10 ccm Wasser gelöst, über Stopfen und Schliff in die Flasche und titriert nach dem Umschütteln mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung<sup>2</sup> bis fast zum Verschwinden der

<sup>1</sup> W. PONNDORF: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 417. Siehe auch Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 160, 48.

<sup>2</sup> PONNDORF empfiehlt am Ende der Titration die Verwendung von 0,01 N.-Thiosulfatlösung.

Rosafärbung des Tetrachlorkohlenstoffs und darauf nach Zusatz von 10 Tropfen 1%iger Stärkelösung zu Ende.

PONNDORF fand bei Methylalkohol etwa 1% und bei Äthylalkohol 0,3% als höchste Fehlerbreite und gibt als Erfahrungsfaktoren an, daß 1 ccm 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung entspricht an

|                            |                                |
|----------------------------|--------------------------------|
| Methylalkohol . . . . .    | 1,7785 mg (Theorie: 1,6016 mg) |
| Äthylalkohol . . . . .     | 2,4417 mg (Theorie: 2,3024 mg) |
| Isopropylalkohol . . . . . | 3,0795 mg (Theorie: 3,0032 mg) |

Bei Butylalkohol, Amylalkohol, Benzylalkohol ist das Verfahren ebenfalls anwendbar, die Fehlerbreite beträgt bei diesen 1—2%.

Mikrobestimmung. W. PONNDORF<sup>1</sup> hat auch ein auf dem gleichen Prinzip beruhendes Mikroverfahren ausgearbeitet, bei dem man unter Verwendung entsprechender Mikroapparatur von 2 ccm Lösung ausgeht und z. B. Mengen von 1—1,5 mg Äthylalkohol mit 92% Genauigkeit bestimmen kann. Hier kann darauf nur verwiesen werden.

#### 4. Überführung der Alkohole in die Alkyljodide nach S. ZEISEL<sup>2</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Überführbarkeit der Alkyle der Alkoxygruppen durch Jodwasserstoffsäure in Jodalkyl und Bestimmung der Doppelverbindung von Jodsilber und Silbernitrat bzw. des daraus mit Wasser entstehenden Jodsilbers.

H. MEYER<sup>3</sup> empfiehlt für die Ausführung der Bestimmung den nebenstehenden Apparat (Abb. 2)<sup>4</sup>.

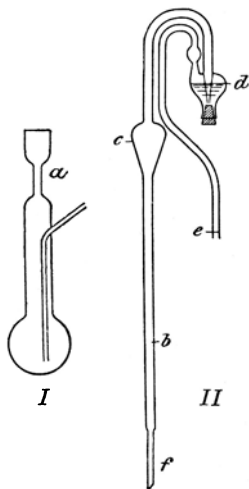


Abb. 2. Apparat zur Alkoholbestimmung nach ZEISEL.

Auf das BAMBERGERSche Siedegefäß *I* wird mittels eines Korkstopfens der MEYERSche Apparat *II* aufgesetzt, dessen Rohr *f* ziemlich genau in die Verengung *a* des Siedegefäßes hineinpaßt. Dadurch wird vermieden, daß Jodwasserstoffsäure zum Korkstopfen gelangt. Das bis zur Biegung 50 cm lange und 1 cm weite Rohr *b* dient als Luftkühler und trägt zur Sicherheit eine konische Erweiterung *c*. In das Gefäß *d* (15 ccm Inhalt), das unten durch einen Korkstopfen verschlossen wird, füllt man nach dem Umkehren des Apparates etwas Wasser und einige Milligramm roten Phosphor ein. Das Ableitungsrohr *e* taucht in das Vorlagekölbchen mit Jodwasserstoffsäure ein; man kann aber auch an *e* mittels eines guten Schlauches ein kurzes Einleitungsrohr Glas an Glas ansetzen, wodurch die Abspülung des Jodsilbers erleichtert wird. An das Vorlagekölbchen kann zur Sicherung der Reaktion noch ein zweites kleineres Kölbchen angeschlossen werden.

Die Silbernitratlösung wird bereitet durch Lösen von 2 g Silbernitrat in 5 ccm Wasser und Zusatz von 45 ccm absolutem Alkohol. Man kocht sie  $\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler und läßt dann 2 Tage an der Sonne stehen, worauf von dem geringen Bodensatz abgesehen wird. Von der im Dunklen aufbewahrten

Lösung gibt man, nötigenfalls durch ein Filter, die nötige Menge vor dem Versuch in das Vorlagekölbchen und setzt ihr schließlich einen Tropfen reine Salpetersäure zu.

Der rote Phosphor wird auf dem siedenden Wasserbade  $\frac{1}{2}$  Stunde mit verdünntem Ammoniak digeriert, abgesaugt und gründlich mit heißem Wasser gewaschen und dann in einer Glasflasche unter Wasser aufbewahrt. Vor jeder Lüftung ist das Wasser zu erneuern und umzuschütteln.

Ausführung der Bestimmung. Der vollständig zusammengestellte Apparat wird zunächst auf dichten Schluß geprüft und die Silberlösung in das Vorlagekölbchen an *e* eingefüllt. Darauf werden 0,2—0,3 g Substanz<sup>5</sup> und

<sup>1</sup> W. PONNDORF: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 424.

<sup>2</sup> S. ZEISEL: Monatsh. Chem. 1885, 6, 989; 1886, 7, 406. — Ber. III. Intern. Kongreß f. angew. Chem. 1898, 2, 63. — H. MEYER: Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen, 5. Aufl., S. 487. Berlin: Julius Springer 1931.

<sup>3</sup> H. MEYER: Monatsh. Chem. 1904, 25, 1213.

<sup>4</sup> Der Apparat ist von der Firma F. Hegershoff-Leipzig beziehbar.

<sup>5</sup> Bei leichtflüchtigen Alkoholen wird die Substanz in einem dünnwandigen Glas-Kügelchen abgewogen, dieses in den Kolben *I* gegeben und darin zertrümmert.

10 ccm Jodwasserstoffsäure (Spez. Gewicht 1,96)<sup>1</sup> in den Kolben *I* eingefüllt und dieser mit dem Apparat *II* verbunden. Darauf wird der Kolben *I* durch einen Mikrobrenner langsam bis zum Sieden des Inhalts erhitzt, während gewaschenes Kohlendioxyd<sup>2</sup> — etwa 3 Blasen in 2 Sekunden — durch den Apparat geleitet wird. Bei unvorsichtigem Erhitzen oder zu raschem Kohlendioxydstrom könnte unveränderter Alkohol mit übergehen. Mit dem Übergehen von Alkyljodid beginnt die Silberlösung in der Vorlage sich zu trüben, und bald wird der Kolbeninhalt durch die Ausscheidung der weißen Doppelverbindung von Silberjodid und Silbernitrat undurchsichtig. Der Inhalt des zweiten Kölbchens bleibt fast immer klar; nur bei sehr alkoxyreichen Substanzen und zu raschem Gang des Kohlendioxydstromes — wobei es auch durch mitdestilliertes Wasser zu Gelbfärbung im ersten Kölbchen kommen kann — zeigt sich manchmal eine schwache Trübung. Das Ende des Versuchs ist fast immer sehr scharf daran zu erkennen, daß die Flüssigkeit sich vollkommen über dem nunmehr krystallinischen Niederschlag klärt. Wenn die Alkylabspaltung sehr langsam erfolgt, kann die Beendigung des Versuchs nicht auf diese Weise erkannt werden. Es empfiehlt sich daher stets<sup>3</sup>, nach dem Absetzen des Niederschlages, das Vorlagekölbchen gegen ein solches mit frischer Lösung — es genügt dann eine viel kleinere Silbernitratmenge — auszutauschen oder rasch durch Dekantation die klare Lösung vom Niederschlag in ein anderes Kölbchen zu leeren und letzteres vorzulegen. Man erhitzt dann noch  $\frac{1}{2}$  Stunde weiter, während der kein neuerlicher Niederschlag auftreten darf, widrigenfalls man nach Klärung des Inhalts nochmals in der geschilderten Weise vorzugehen hat.

Die Dauer der Bestimmung beträgt im allgemeinen  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden. Nun werden die beiden Vorlagekölbchen samt Zuleitungsrohr vom Apparat abgenommen, der Inhalt des zweiten mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt und, falls nach mehreren Minuten keine Trübung entsteht, nicht weiter berücksichtigt, sonst mit dem Inhalt des ersten Kölbchens vereinigt und auf etwa 500 ccm mit Wasser verdünnt. Von dem Zuleitungsrohr wird der anhaftende Niederschlag, der gewöhnlich (durch Phosphorsilber?) dunkel gefärbt ist, mit Federfahne und Spritzflasche entfernt und in das Becherglas gespült. Der Inhalt des Becherglases wird nun auf dem Wasserbade auf die Hälfte eingedampft, mit Wasser und wenigen Tropfen Salpetersäure wieder aufgefüllt, bis zum völligen Absitzen des gelben Jodsilberniederschlags digeriert und dann in üblicher Weise das Jodsilber bestimmt<sup>4</sup>.

Berechnung des Methyl- und Äthylalkohols. 100 g Jodsilber entsprechen:

|   |     |  |
|---|-----|--|
| 13,20 g Methoxyl (CH <sub>3</sub> O)              | und | 13,64 g Methylalkohol (CH <sub>3</sub> ·OH)              |
| 19,21 g Äthoxyl (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O) | „   | 19,62 g Äthylalkohol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ·OH) |

## 5. Oxydation der Alkohole.

Die Alkohole (Methyl-, Äthyl-, Propylalkohol) werden durch Kaliumpermanganat in saurer und alkalischer Lösung, durch Chromsäure (Kaliumdichromat-Schwefelsäure) und durch Persulfate in saurer Lösung oxydiert. Die Alkohole können daher in Lösungen, die keine anderen oxydierbaren Stoffe enthalten, in der Weise bestimmt werden, daß sie mit einem Überschuß der

<sup>1</sup> Brauchbare „Jodwasserstoffsäure für Methoxylbestimmungen“ wird von C. A. F. Kahlbaum-Berlin in den Handel gebracht.

<sup>2</sup> In die Waschflasche des Kohlensäureapparates gibt man verdünnte wäßrige Silbernitratlösung, um etwaigen aus dem Marmor entwickelten Schwefelwasserstoff zu entfernen.

<sup>3</sup> PERKIN: Journ. Chem. Soc. London 1903, 83, 1370.

<sup>4</sup> PERKIN zieht vor, die alkoholische Silberlösung langsam in kochendes, mit Salpetersäure versetztes Wasser einzutragen und bis zum Vertreiben der Hauptmenge des Alkohols einzudampfen.

Oxydationsmittel behandelt und deren nicht verbrauchter Teil durch Titration mit Reduktionsmitteln zurückgemessen wird.

Vgl. dazu die Bestimmung von Methylalkohol (S. 996), Äthylalkohol (S. 1011) und Propylalkohol (S. 1014).

## II. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Alkohole.

### A. Methylalkohol.

Methylalkohol (Methanol),  $\text{CH}_3 \cdot \text{OH}$ , ist eine farblose, flüchtige, in reinem Zustande geruchlose, giftige, mit blaßblauer Flamme brennende Flüssigkeit vom Spez. Gewicht 0,796 (20°) und dem Siedepunkt 66,2—66,8°, die sich mit Wasser, Äthylalkohol, Äther und Chloroform in jedem Verhältnis mischt<sup>1</sup>.

#### 1. Nachweis des Methylalkohols.

Der größte Teil der zahlreichen Verfahren beruht einerseits auf der Veresterung und andererseits auf der Oxydation des Methylalkohols zu Formaldehyd. Von den Veresterungsverfahren, die als besonders spezifisch anzusehen sind, ist namentlich das Verfahren von W. AUTENRIETH zu empfehlen und von den Oxydationsverfahren hat das von DENIGÈS-V. FELLEBERG in der Praxis am meisten Anwendung gefunden. Letzterem gegenüber besitzt das ebenfalls viel angewendete Verfahren von G. FENDLER und C. MANNICH den Nachteil, daß es verhältnismäßig umständlich ist und daran krankt, daß bei der Farbreaktion mit Morphin-Schwefelsäure vielfach Mißfärbungen auftreten und das Reagens nicht hinreichend haltbar ist.

##### a) Veresterungsverfahren.

**α) p-Brombenzoesäure-methylester.** Man versetzt nach W. AUTENRIETH<sup>2</sup> 40—50 ccm Flüssigkeit mit 10 ccm Natronlauge (10%), erwärmt in einer Glasstöpselflasche auf 45°, gibt je nach dem erwarteten Gehalt an Methylalkohol 1—5 g zerriebenes p-Brombenzoylchlorid hinzu und schüttelt bis zum Erkalten kräftig durch. Von Zeit zu Zeit ist mit Lackmus zu prüfen, ob das Gemisch noch alkalisch reagiert; bei saurer Reaktion ist ein weiterer Zusatz von Natronlauge zu machen. Bei Gegenwart von Methylalkohol scheidet sich der p-Brombenzoesäure-methylester als ein weißes, meist krümeliges Pulver ab, das abfiltriert, mit kaltem Wasser alkalifrei gewaschen und auf einem Tonteller oder im Vakuum-exsiccator getrocknet wird; Schmelzpunkt 78—79°.

Besser krystallisiert man das erhaltene Pulver nach dem Auswaschen aus Äthylalkohol, Methylalkohol oder Aceton um, indem man mit dem Lösungsmittel eine bei 15—20° gesättigte Lösung herstellt, diese filtriert, mit dem gleichen Raumteil Wasser mischt, rasch umrührt und in Eis stellt. Der p-Brombenzoesäure-methylester wird hierbei aus Äthylalkohol in glänzenden Blättchen, aus Methylalkohol in feinen Nadeln erhalten. Aus heißer Benzollösung

<sup>1</sup> Nach dem Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch soll sich 1 ccm Methylalkohol in 10 ccm Wasser völlig klar lösen. Läßt man 2 ccm Schwefelsäure unter Abkühlung in 2 ccm Methylalkohol eintropfen, so darf sich die Mischung höchstens schwach gelblich färben (Nachweis fremder organischer Substanzen). — Eine Mischung aus 1 ccm Silbernitratlösung, 5 Tropfen Ammoniakflüssigkeit und 10 ccm Methylalkohol soll sich beim Stehen im Dunkeln innerhalb 10 Minuten nicht verändern (Nachweis reduzierender Substanzen). Versetzt man 10 ccm Methylalkohol mit 5 Tropfen Kaliumpermanganatlösung (1 g/l), so darf die rote Farbe der Flüssigkeit nicht vor Ablauf von 10 Minuten in Gelb übergehen (Nachweis von Aldehyden).

<sup>2</sup> W. AUTENRIETH: Arch. Pharm. 1920, 258, 1; Die Auffindung der Gifte, 1923, S. 90.

krystallisiert der Ester auf Zusatz von Petroläther in glänzenden Blättchen. Von kaltem Alkohol wird er zu 2,3% gelöst; in Aceton ist er leichter löslich.

Zur näheren Identifizierung kann man den Ester auch in p-Brombenzoesäure-amid (Schmelzpunkt 188°) überführen. Es lassen sich nach diesem Verfahren in wäßriger Lösung noch 0,2% Methylalkohol neben 0,8% Äthylalkohol nachweisen. Äthylalkohol stört nicht, weil sein Ester bei stärkerer Verdünnung nicht so leicht entsteht und bei  $-16^{\circ}$  noch nicht krystallisiert. Liegen Gemische beider Alkohole vor, so reichert man durch Destillation den Methylalkohol in der ersten Fraktion an. — Das Verfahren ist auch zur annähernden Bestimmung des Methylalkohols verwendbar.

**β) Sonstige Ester.** Als zum Nachweis von Methylalkohol geeignet sind auch folgende Ester empfohlen worden:

**Borsäure-methylester.** Mischt man nach E. PIESCZEK<sup>1</sup> in einem Schälchen fein zerriebenen Borax mit Methylalkohol, so entsteht nach dem Anzünden (auch ohne Schwefelsäure) eine schön smaragdgrüne, sehr intensive Färbung der Flamme, was ohne Schwefelsäure mit Äthylalkohol oder Acetaldehyd nicht eintritt. Diese Erscheinung ist noch bei 5% Methylalkohol zu beobachten. Die Reaktion wird verschärft, wenn man vor dem Anzünden 1—2 Minuten wartet und im Dunkeln beobachtet.

**Oxalsäure-dimethylester.** Das Verfahren von A. HELLRIEGEL<sup>2</sup> beruht auf der Erhitzung des Methylalkohols mit Oxalsäure. Der Schmelzpunkt des Esters liegt bei 54°.

**p-Nitrobenzoesäure-methylester.** Die Darstellung erfolgt nach dem Verfahren von A. BAUMANN (S. 977). Der Ester schmilzt bei 67°.

**Methyl-urethan.** Man läßt äquivalente Mengen von Methylalkohol und Harnstoffchlorid in ätherischer Lösung aufeinander einwirken. Tafeln vom Schmelzpunkt 57—58°.

**Salicylsäure-methylester.** W. SAILER<sup>3</sup> erkennt diesen Ester und ebenso den β-Naphthol-methylester an ihrem charakteristischen Geruch; nach G. MAUE<sup>4</sup> ist das letztere Verfahren unsicher.

**Methyljodid.** FR. WIRTHLE<sup>5</sup> führt den Methylalkohol in Methyljodid über (S. 994) und weist den Methylalkohol durch den Siedepunkt und die Verseifungszahl der gebildeten Alkyljodide nach. Der Siedepunkt des Methyljodids liegt bei 41—42°, der des Äthyljodids bei 71—72°. Die Verseifungszahl des Methyljodids beträgt 394,3, die des Äthyljodids 358,9.

## b) Oxydationsverfahren.

Die Oxydation erfolgt mit Kaliumpermanganat, Kaliumdichromat, Persulfaten oder mit Kupfer.

**α) Verfahren von DENIGES-v. FELLENBERG.** Dieses bewährteste Verfahren, dessen Vorzüge Empfindlichkeit, leichte Ausführbarkeit, Haltbarkeit des Reagens, lange Sichtbarkeit der Endreaktion sind und das auch zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen von Methylalkohol geeignet ist (S. 996), beruht auf der Oxydation des Methylalkohols mittels Kaliumpermanganats zu Formaldehyd und dessen Nachweis mit Fuchsinbisulfit (Fuchsin-schwefliger Säure), auf den G. DENIGES<sup>6</sup> zuerst hingewiesen hat.

Das Verfahren ist vielfach nachgeprüft und in den Einzelheiten der Ausführung verbessert worden. Diese Verbesserungen erstrecken sich teils darauf, den Farbton der Lösungen durch Änderung in der Zusammensetzung der Fuchsinbisulfitlösung<sup>7</sup> zu verbessern (TH. v. FELLENBERG<sup>8</sup>, I. M. KOLTHOFF<sup>9</sup>), teils auf eine vollkommener Oxydation des Methylalkohols zu Formaldehyd

<sup>1</sup> PIESCZEK: Pharm. Ztg. 1913, 58, 850.

<sup>2</sup> A. HELLRIEGEL: Pharm. Ztg. 1912, 57, 7.

<sup>3</sup> W. SAILER: Pharm. Ztg. 1912, 57, 93 u. 1917, 62, 143.

<sup>4</sup> G. MAUE: Z. 1918, 35, 179.

<sup>5</sup> FR. WIRTHLE: Z. 1912, 23, 345 u. 24, 14.

<sup>6</sup> G. DENIGES: Compt. rend. Paris 1910, 150, 832; C. 1910, I, 1992.

<sup>7</sup> Anstatt des Fuchsinbisulfitreagens ist noch eine ganze Reihe anderer Nachweismethoden für den Formaldehyd vorgeschlagen. Eine Zusammenstellung solcher findet sich bei DENSLAGE und WINDHAUSEN (Z. 1926, 52, 117). Vgl. ferner S. 1036.

<sup>8</sup> TH. v. FELLENBERG: Biochem. Zeitschr. 1918, 85, 62.

<sup>9</sup> I. M. KOLTHOFF: Pharm. Weekbl. 1922, 59, 1268; C. 1923, II, 267.



(I. M. KOLTHOFF<sup>1</sup>, LA WALL<sup>2</sup>, F. R. GEORGIA und R. MORALES<sup>3</sup>, A. B. LYONS<sup>4</sup>). Nach den vergleichenden Untersuchungen von E. DINSLAGE und O. WINDHAUSEN<sup>5</sup> führt man die Reaktion zweckmäßig in der verbesserten Form von v. FELLEBERG aus und verwendet als Farbreagens die Fuchsinbisulfitlösung nach H. GROSSE-BOHLE<sup>6</sup>.

Bereitung der Fuchsinbisulfitlösung. 0,5 g Rosanilinchlorhydrat (auch Diamantfuchsin) werden unter Erwärmen in 250 ccm Wasser gelöst und mit 12,5 g kryst. Natriumsulfit und 7,5 ccm Salzsäure (25%) auf 500 ccm mit Wasser aufgefüllt.

Ausführung des Verfahrens. In einem geräumigen Reagensglase werden 0,25 ccm des zu untersuchenden alkoholischen Destillates mit 5 ccm einer 1%igen Kaliumpermanganatlösung und 0,2 ccm reiner konz. Schwefelsäure versetzt und geschüttelt. Nach Verlauf von 2—3 Minuten wird 1 ccm einer etwa 8%igen Oxalsäurelösung hinzugefügt und umgeschüttelt. Nach wenigen Sekunden hat die Lösung Madeirafarbe angenommen. Man setzt nun noch 1 ccm konz. Schwefelsäure hinzu, wobei die Färbung verschwindet, und versetzt mit 5 ccm Fuchsinbisulfitlösung. Nach kurzer Zeit entsteht bei Anwesenheit von Methylalkohol eine violette bis rote Färbung, welche in der Regel nach 15 bis 20 Minuten ihren Höchstwert erreicht hat und stundenlang bestehen bleibt.

Außer Methylalkohol geben auch n-Propyl-, i-Propyl-, i-Butyl- und Amylalkohol (Fuselöl), ferner Zucker eine schwache und Glycerin eine stark positive Reaktion nach DENIGÈS. In Fällen, wo Beimischungen dieser Stoffe in Frage kommen, wird man sie durch Destillation und Untersuchung der ersten Destillatanteile entfernen bzw. unwirksam machen. Der Einfluß von Äthylalkohol bzw. Acetaldehyd wird durch den Zusatz von 1 ccm Schwefelsäure unschädlich gemacht; unterbleibt dagegen dieser Zusatz, so gibt auch Äthylalkohol (S. 998) eine ähnliche, aber mehr rötliche Färbung als Methylalkohol, die aber innerhalb 1 Stunde verschwindet, während bei Gegenwart von Methylalkohol die Farbreaktion, und zwar in verstärktem Maße 48 Stunden und länger bestehen bleibt. Etwa von vornherein in der zu untersuchenden Lösung vorhandener Formaldehyd ist natürlich vor Ausführung der Reaktion zu entfernen, z. B. durch Bisulfit.

β) Verfahren von G. FENDLER und C. MANNICH<sup>7</sup>. 1 ccm der zu untersuchenden Lösung wird mit 4 ccm Schwefelsäure (20 g Schwefelsäure in 100 g) versetzt und alsdann wird 1 g fein zerriebenes Kaliumpermanganat in kleinen Teilmengen unter lebhaftem Umschütteln hinzugefügt. Das Gemisch soll nicht wärmer als etwa 50° werden; es ist daher nötigenfalls durch Einhalten in kaltes Wasser entsprechend abzukühlen. Sobald die Umsetzung beendet ist, wird die Flüssigkeit durch ein kleines trockenes Filter unter Zurückgießen der ersten abgelauenen Tropfen in ein starkwandiges Probierringlas klar abfiltriert und der meist schwach rötlich gefärbte Filterablauf gut verschlossen beiseite gestellt, bis er farblos geworden ist. Die so vorbereitete Probe wird durch Einstellen in Eiswasser abgekühlt, mit 2 ccm reiner Schwefelsäure (D = 1,84) versetzt und die Flüssigkeit mit einem Glasstab vorsichtig durchgerührt. Sodann wird 1 ccm einer frisch bereiteten Lösung von 0,2 g Morphin oder Morphinsulfat in 10 ccm reiner Schwefelsäure (D = 1,84) hinzugefügt. Ist Methylalkohol vorhanden, so entsteht eine violette Färbung, die entweder sofort oder erst nach 10—20 Minuten auftritt und in vielen Fällen rasch in eine Mißfärbung übergeht. Hat sich die Probe bereits nach dem Schwefelsäurezusatz erheblich dunkel gefärbt, oder

<sup>1</sup> Siehe Fußnote 9, S. 991.

<sup>2</sup> LA WALL: Amer. Journ. Pharmac. 1924, 95, 812; C. 1924, I, 1420.

<sup>3</sup> F. R. GEORGIA u. R. MORALES: Ind. Engin. Chem. 1926, 18, 304; C. 1926, I, 3104.

<sup>4</sup> A. B. LYONS: Journ. Amer. pharmac. Assoc. 1923, 11, 682; C. 1923, II, 1138.

<sup>5</sup> E. DINSLAGE u. O. WINDHAUSEN: Z. 1926, 52, 117.

<sup>6</sup> H. GROSSE-BOHLE: Nach H. FINCKE: Z. 1914, 27, 248.

<sup>7</sup> G. FENDLER u. C. MANNICH: Arb. a. d. Berliner Pharm. Institut 1905, 3, 243; Pharm. Zentralh. 1905, 46, 794; Pharm. Ztg. 1911, 56, 860; C. 1906, II, 821.

entsteht bei Zusatz des Morphins zugleich eine braune bis schwarze Mißfärbung, so ist der ganze Versuch zu wiederholen. Die Empfindlichkeit des Nachweises beträgt 0,01 mg/l.

B. PFYL, G. REIF und A. HANNER<sup>1</sup> haben das Verfahren von FENDLER und MANNICH durch Ersatz des Morphins durch Apomorphin, Guajacol oder Gallussäure abgeändert. 0,1 ccm des nach FENDLER und MANNICH gekühlten Filtrates vom Kaliumpermanganatniederschlag wird zu 0,5 ccm einer gut gekühlten Lösung von 0,02 g Guajacol in 10 ccm konz. Schwefelsäure hinzugefügt, zweckmäßig unter Benutzung eines auf weißer Unterlage ruhenden Uhrglases; bei positivem Ausfall ist eine hellrote bis rote, bei negativem Ausfall eine schwach gelbe Farbe zu beobachten. Vgl. auch S. 1006.

Statt der Morphinreaktion empfiehlt R. COHN<sup>2</sup>, den Nachweis von Methylalkohol durch die Schichtprobe mit Resorcin und konz. Schwefelsäure auszuführen.

γ) Verfahren von L. E. HINKEL<sup>3</sup>. 1 ccm des zu prüfenden Alkohols wird in einem Kölbchen mit dem Oxydationsgemisch (0,8 g Ammoniumpersulfat + 3 ccm verd. Schwefelsäure (1:5) oder 1,5 g Kaliumbichromat + 1,5 ccm konz. Schwefelsäure, beide Gemische mit 20 ccm Wasser verdünnt) bei vorgelegtem Kühler destilliert. Vom Destillat werden je 2 ccm in 5 Reagensgläsern aufgefangen. Während die beiden ersten Fraktionen Acetaldehyd enthalten, findet sich etwa aus Methylalkohol gebildeter Formaldehyd in den drei letzten Fraktionen. Man setzt zu jeder von ihnen einige Tropfen einer 0,5%igen Lösung von Morphinchlorhydrat und unterschichtet mit konz. Schwefelsäure. Bei Gegenwart von Formaldehyd entsteht ein tief violetter Ring. Die Reaktion ist sehr empfindlich; sie tritt noch bei einer Verdünnung des Formaldehyd 1:1000000 ein.

δ) Sonstige Oxydationsverfahren. Es oxydieren den Methylalkohol zu Formaldehyd mittels Chromsäure bzw. Kaliumbichromat und Schwefelsäure die Verfahren von E. VOISINET<sup>4</sup>, A. VORISEK<sup>5</sup>, A. BONO<sup>6</sup>, W. SAILER<sup>7</sup>, J. B. SUMNER<sup>8</sup> und AUFRECHT<sup>9</sup>, mittels Natriumpersulfats das Verfahren von U. PAZIENTI<sup>10</sup> und mittels einer Kupferspirale die Verfahren von J. KALM<sup>11</sup>, F. UTZ<sup>12</sup>, S. P. MULLIKEN-H. SCUDDER<sup>13</sup>, H. SCUDDER und R. B. RIGGS<sup>14</sup>, A. RINCK<sup>15</sup>, H. W. VAN URK<sup>16</sup>.

Alle diese Verfahren, die meist den gebildeten Formaldehyd nach den üblichen Verfahren nachweisen, sind zum Teil wenig empfindlich und nicht hinreichend nachgeprüft; sie bieten gegenüber den unter α-γ angeführten Verfahren keine nennenswerten Vorzüge.

## 2. Bestimmung des Methylalkohols.

Handelt es sich lediglich um die Bestimmung des Methylalkohols in wäßrigen reinen Lösungen, so genügt im allgemeinen die Ermittlung des Spezifischen

<sup>1</sup> B. PFYL, G. REIF u. A. HANNER: Pharm. Zentralh. 1922, **63**, 193.

<sup>2</sup> R. COHN: Chem.-Ztg. 1922, **45**, 997; Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 1922, **31**, 423.

<sup>3</sup> L. E. HINKEL: Analyst 1908, **33**, 417; Z. 1909, **18**, 324.

<sup>4</sup> E. VOISINET: Bull. Soc. chim. France 1906, **35**, 748; C. 1906, **II**, 1284.

<sup>5</sup> A. VORISEK: Journ. Soc. chem. Ind. 1909, **28**, 823; C. 1909, **II**, 1083.

<sup>6</sup> A. BONO: Chem.-Ztg. 1912, **36**, 1171.

<sup>7</sup> W. SAILER: Pharm. Ztg. 1912, **57**, 165; C. 1912, **I**, 1147.

<sup>8</sup> J. B. SUMNER: Journ. Amer. Chem. Soc. 1923, **45**, 2378; Z. 1925, **49**, 55.

<sup>9</sup> AUFRECHT: MERCKs Reagenzienverzeichnis 1929, S. 20.

<sup>10</sup> U. PAZIENTI: Bol. chim. Pharm. 1916, **54**, 738; C. 1916, **I**, 1042.

<sup>11</sup> J. KALM: Pharm. Ztg. 1905, **50**, 651; C. 1905, **II**, 711.

<sup>12</sup> F. UTZ: Pharm. Zentralh. 1905, **46**, 736.

<sup>13</sup> S. P. MULLIKEN u. H. SCUDDER: Amer. Chem. Journ. 1899, **21**, 266; 1900, **24**, 44; C. 1899, **I**, 998; 1900, **II**, 1294. — Vgl. auch E. JANDRIER: Ann. Chim. analyt. 1899, **4**, 156; C. 1899, **I**, 1296.

<sup>14</sup> H. SCUDDER u. R. B. RIGGS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1906, **28**, 1202; C. 1906, **II**, 1285.

<sup>15</sup> A. RINCK: Z. 1914, **28**, 98.

<sup>16</sup> H. W. VAN URK: Pharm. Weekbl. 1923, **60**, 273; C. 1923, **II**, 1157.

Gewichtes oder der Refraktion der Lösung, worauf man den Gehalt aus einer geeigneten Tabelle abliest. In anderen Fällen verwendet man die Oxydation zu Kohlensäure (S. 997) und für die Bestimmung kleiner Mengen Methylalkohol das colorimetrische Verfahren nach DENIGÈS-V. FELLEBERG (S. 996).

#### a) Bestimmung aus dem Spezifischen Gewicht.

Liegt eine reine wäßrige Methylalkohollösung in hinreichender Menge vor, so kann man ihr Spezifisches Gewicht mit einem Pyknometer bestimmen und den annähernden Methylalkoholgehalt aus der Tabelle 2 auf S. 995 ablesen.

#### b) Refraktometrische Bestimmung.

Liegt eine reine wäßrige Methylalkohollösung vor, so kann man ihre Refraktion bestimmen und den Methylalkoholgehalt aus der für das ZEISSsche Eintauchrefraktometer gültigen Tabelle 3 auf S. 995 ablesen.

Zu beachten ist hierbei, daß die Skalenteile 15—41 dieses Refraktometers doppelten Werten entsprechen. Um festzustellen, ob Methylalkohol von niedrigem (A) oder hohem (B) Prozentgehalt vorliegt, verdünnt man ihn mit Wasser auf das doppelte Volumen und bestimmt nochmals die Refraktion. Der so gefundene Wert ergibt verdoppelt den wirklichen Prozentgehalt.

#### c) Verfahren von G. REIF<sup>1</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Fähigkeit des Jodmethyls, sich mit Schwefelmethyl bereits in der Kälte zu Trimethylsulfinjodid zu verbinden nach der Gleichung  $\text{CH}_3\text{J} + (\text{CH}_3)_2\text{S} = (\text{CH}_3)_3\text{SJ}$ ; die entsprechende Äthylverbindung entsteht bei Zimmertemperatur nicht, falls der Gehalt des Äthyl-Methyljodid-Gemisches an Methyljodid nicht zu gering ist. Das Trimethylsulfinjodid verhält sich wie ein jodwasserstoffsäures Salz und läßt sich leicht titrimetrisch bestimmen. Die Darstellung der Alkyljodide erfolgt am besten nach dem Verfahren von F. WIRTHLE<sup>2</sup> (s. unten!).

2 ccm des Jodmethylgemisches werden in ein etwa 20 ccm fassendes Kölbchen gebracht und mit 2 ccm Methylsulfid bzw. nur 1,5 ccm Methylsulfid sowie 0,5 ccm über Natrium getrocknetem Äther, falls weniger als 5% Methyljodid vorhanden sind, versetzt. Das fest verschlossene Kölbchen läßt man etwa 20—24 Stunden bei einer Temperatur von 19—20° stehen. Dann spült man das entstandene Trimethylsulfinjodid mit Äther auf ein mit trockenem Äther befeuchtetes Filter und wäscht gut damit aus. Der Trichter samt Filter und Niederschlag wird auf ein etwa 100 ccm fassendes Stöpselglas gesetzt, und die Krystalle auf dem Filter werden mit Wasser gelöst. Die wäßrige Lösung wird darauf mit 0,1 N.-Silbernitratlösung titriert. Wenn genug Silbernitrat zugesetzt ist, nimmt die Flüssigkeit einen Stich ins Grüne an. Ein etwaiger Überschuß an Silbernitrat kann mit Rhodanammonium zurücktitriert werden. Die Berechnung der titrimetrischen Bestimmung gestaltet sich sehr einfach, da ein Molekül Silbernitrat einem Molekül Trimethylsulfinjodid (Mol.-Gew. = 204,06) bzw. Methylalkohol (Mol.-Gew. = 32,03) entspricht.

Darstellung der Alkyljodide nach F. WIRTHLE<sup>2</sup>. 10 ccm des Methylalkohol-Äthylalkohol-Gemisches werden in ein kleines Destillationskölbchen, das sich in einer Schale mit Eiswasser befindet, gebracht. Dazu wird eine entsprechende Menge roter Phosphor (1 ccm Äthylalkohol erfordert 0,18 g, 1 ccm Methylalkohol 0,26 g Phosphor) gegeben, der Kolben schnell mit einem schräg aufsteigenden Kühler mittels Glasschliff verbunden und das Kölbchen wieder in die Schale mit Eiswasser gestellt. Dann wird mit dem Eintragen

<sup>1</sup> G. REIF: Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1915, 50, 50; Z. 1916, 31, 396; C. 1915, II, 1056.

<sup>2</sup> F. WIRTHLE: Z. 1912, 24, 14.

Tabelle 2. Spezifische Gewichte bei  $\frac{15,56^{\circ}}{40}$  von Methylalkohol-Wasser-Mischungen nach W. DITTMAR und CH. A. FAWSITT<sup>1</sup>.

| CH <sub>4</sub> O % | Spez. Gewicht | CH <sub>4</sub> O % | Spez. Gewicht | CH <sub>4</sub> O % | Spez. Gewicht | CH <sub>4</sub> O % | Spez. Gewicht | CH <sub>4</sub> O % | Spez. Gewicht |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
| 1                   | 0,99729       | 21                  | 0,96666       | 41                  | 0,93510       | 61                  | 0,89580       | 81                  | 0,84779       |
| 2                   | 554           | 22                  | 524           | 42                  | 335           | 62                  | 358           | 82                  | 521           |
| 3                   | 382           | 23                  | 381           | 43                  | 155           | 63                  | 133           | 83                  | 262           |
| 4                   | 214           | 24                  | 238           | 44                  | 0,92975       | 64                  | 0,88905       | 84                  | 001           |
| 5                   | 048           | 25                  | 093           | 45                  | 793           | 65                  | 676           | 85                  | 0,83738       |
| 6                   | 0,98893       | 26                  | 0,95949       | 46                  | 610           | 66                  | 443           | 86                  | 473           |
| 7                   | 726           | 27                  | 802           | 47                  | 424           | 67                  | 208           | 87                  | 207           |
| 8                   | 569           | 28                  | 655           | 48                  | 237           | 68                  | 0,87970       | 88                  | 0,82938       |
| 9                   | 414           | 29                  | 506           | 49                  | 047           | 69                  | 714           | 89                  | 668           |
| 10                  | 262           | 30                  | 355           | 50                  | 0,91855       | 70                  | 487           | 90                  | 396           |
| 11                  | 111           | 31                  | 211           | 51                  | 661           | 71                  | 262           | 91                  | 123           |
| 12                  | 0,97962       | 32                  | 053           | 52                  | 465           | 72                  | 021           | 92                  | 0,81849       |
| 13                  | 814           | 33                  | 0,94894       | 53                  | 267           | 73                  | 0,86779       | 93                  | 572           |
| 14                  | 668           | 34                  | 732           | 54                  | 066           | 74                  | 535           | 94                  | 293           |
| 15                  | 523           | 35                  | 567           | 55                  | 0,90863       | 75                  | 290           | 95                  | 013           |
| 16                  | 379           | 36                  | 399           | 56                  | 657           | 76                  | 042           | 96                  | 0,80731       |
| 17                  | 235           | 37                  | 228           | 57                  | 450           | 77                  | 0,85793       | 97                  | 448           |
| 18                  | 093           | 38                  | 055           | 58                  | 239           | 78                  | 542           | 98                  | 164           |
| 19                  | 0,96950       | 39                  | 0,93877       | 59                  | 026           | 79                  | 290           | 99                  | 0,79876       |
| 20                  | 808           | 40                  | 697           | 60                  | 0,89798       | 80                  | 035           | 100                 | 589           |

Tabelle 3. Refraktionen von Methylalkohol-Wasser-Mischungen bei 17,5° (Skalenteile des Eintauchrefraktometers von Zeiss).

| Skalenteile | Methylalkohol (g in 100 ccm) |                    | Skalenteile | Methylalkohol (g in 100 ccm) |       | Skalenteile | Methylalkohol (g in 100 ccm) |       |
|-------------|------------------------------|--------------------|-------------|------------------------------|-------|-------------|------------------------------|-------|
|             | A                            | B                  |             | A                            | B     |             | A                            | B     |
|             |                              |                    | 18          | 5,25                         | 74,55 | 30,5        | 21,50                        | 66,70 |
| 6,05        | —                            | 79,58 <sup>2</sup> | 18,5        | 5,89                         | 74,30 | 31          | 22,15                        | 66,30 |
| 6,5         | —                            | 79,40              | 19          | 6,70                         | 74,05 | 31,5        | 22,85                        | 65,85 |
| 7           | —                            | 79,20              | 19,5        | 7,40                         | 73,80 | 32          | 23,50                        | 65,40 |
| 7,5         | —                            | 79,00              | 20          | 8,10                         | 73,55 | 32,5        | 24,25                        | 64,95 |
| 8           | —                            | 78,80              | 20,5        | 8,80                         | 73,30 | 33          | 24,95                        | 64,50 |
| 8,5         | —                            | 78,60              | 21          | 9,50                         | 73,05 | 33,5        | 25,70                        | 64,00 |
| 9           | —                            | 78,40              | 21,5        | 10,18                        | 72,80 | 34          | 26,45                        | 63,50 |
| 9,5         | —                            | 78,20              | 22          | 10,85                        | 72,55 | 34,5        | 27,20                        | 62,95 |
| 10          | —                            | 78,00              | 22,5        | 11,53                        | 72,27 | 35          | 27,95                        | 62,40 |
| 10,5        | —                            | 77,80              | 23          | 12,20                        | 72,00 | 35,5        | 28,75                        | 61,77 |
| 11          | —                            | 77,60              | 23,5        | 12,85                        | 71,70 | 36          | 29,55                        | 61,15 |
| 11,5        | —                            | 77,40              | 24          | 13,50                        | 71,40 | 36,5        | 30,40                        | 60,42 |
| 12          | —                            | 77,20              | 24,5        | 14,13                        | 71,07 | 37          | 31,25                        | 59,70 |
| 12,5        | —                            | 77,00              | 25          | 14,75                        | 70,75 | 37,5        | 32,15                        | 58,85 |
| 13          | —                            | 76,80              | 25,5        | 15,35                        | 70,42 | 38          | 33,05                        | 58,00 |
| 13,5        | —                            | 76,57              | 26          | 15,95                        | 70,10 | 38,5        | 34 20                        | 57,02 |
| 14          | —                            | 76,35              | 26,5        | 16,53                        | 69,75 | 39          | 35 30                        | 56,05 |
| 14,5        | —                            | 76,12              | 27          | 17,10                        | 69,40 | 39,5        | 36 78                        | 54,90 |
| 15          | —                            | 75,90              | 27,5        | 17,70                        | 69,02 | 40          | 38 25                        | 53,75 |
| 15,5        | 1,00                         | 75,67              | 28          | 18,30                        | 68,65 | 40,5        | 40 25                        | 51,77 |
| 16          | 1,95                         | 75,45              | 28,5        | 18,95                        | 68,30 | 41          | 42 25                        | 49,50 |
| 16,5        | 2,85                         | 75,22              | 29          | 19,55                        | 67,90 | 41,35       | 45,75                        | —     |
| 17          | 3,70                         | 75,00              | 29,5        | 20,20                        | 67,50 |             |                              |       |
| 17,5        | 4,48                         | 74,77              | 30          | 20,85                        | 67,10 |             |                              |       |

<sup>1</sup> W. DITTMAR u. CH. A. FAWSITT: Trans. Royal Soc. Edinburgh 33 II, 509; Zeitschr. analyt. Chem. 1890, 29, 83. <sup>2</sup> = 100 Gewichtsprozent.

von Jod (für 1 ccm Äthylalkohol 2,2 g, für 1 ccm Methylalkohol 3,18 g Jod) begonnen, indem man den Kolben rasch vom Kühler wegnimmt und 3 g Jod zugibt und wieder schnell mit dem Kühler verbindet. Die erforderliche Jodmenge ist innerhalb 20 Minuten eingetragen. Darauf setzt man das Kölbchen auf ein nicht angeheiztes Wasserbad und bringt an dem oberen Ende des Kühlers ein in Kalilauge eintauchendes Kugelrohr an. Tritt nach einigen Minuten die Reaktion nicht von selbst ein, so beginnt man vorsichtig mit kleiner Flamme das Wasserbad zu erwärmen; allmählich bringt man den Kolbeninhalt in mäßiges Sieden. Nach dem Aufhören der Jodwasserstoffentwicklung (nach 1—1½ Stunden) läßt man den Kolbeninhalt erkalten und nimmt das Kugelrohr ab. Darauf destilliert man die Jodide in einen länglichen Scheidetrichter von etwa 80 ccm Inhalt, der 10 ccm kaltes Wasser als Vorlage enthält, unter allmählicher Steigerung der Temperatur und guter Kühlung über. Die Destillation dauert etwa 1 Stunde. Zur Entfärbung werden die Jodide im Scheidetrichter mit 15 ccm einer 10%igen, gut gekühlten Kalilauge etwa 50mal umgeschwenkt und ¼ Stunde damit stehen gelassen, worauf die überstehende Flüssigkeit mit einer Pipette soweit wie möglich abgesaugt wird. Man wäscht dann mit 40 ccm kaltem Wasser mehrmals in der gleichen Weise aus und erhält so die farblosen Jodide, die man verschlossen im Eisschrank aufbewahrt.

#### d) Oxydationsverfahren.

Zur Bestimmung des Methylalkohols verwendet man die Oxydation mit Chromsäure (bzw. Kaliumbichromat und Schwefelsäure) und Kaliumpermanganat; hierbei können je nach den Oxydationsbedingungen Formaldehyd, Ameisensäure<sup>1</sup> und schließlich Kohlensäure gebildet werden. Für die quantitative Bestimmung geeignet sind Formaldehyd und Kohlensäure<sup>2</sup>.

##### α) Colorimetrische Bestimmung des Methylalkohols nach DENIGÈS - v. FELLEBERG.

Das colorimetrische Verfahren zum Nachweis von Methylalkohol mittels Fuchsinbisulfits (S. 991) ist namentlich zur Bestimmung geringer Mengen von Methylalkohol geeignet. Da aber die Stärke der Reaktion nicht proportional mit dem Gehalte der Lösung an Methylalkohol zunimmt, sondern bedeutend rascher, ist es nach v. FELLEBERG notwendig, eine Anzahl von Typen aufzustellen, von welchen eine der zu prüfenden Lösung sehr nahe kommen muß. Da die Färbung bei Anwesenheit von viel Äthylalkohol etwas rascher auftritt, setzt man bei sehr alkoholarmen Lösungen zweckmäßig dem Reaktionsgemisch gleich zu Anfang einen Tropfen Äthylalkohol zu.

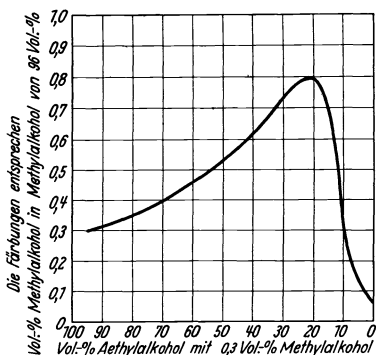


Abb. 3. Darstellung der Abhängigkeit der Farbenintensität der Methylalkoholreaktion nach DENIGÈS - v. FELLEBERG vom Äthylalkoholgehalt der Lösung.

H. JEGLINSKI<sup>3</sup> hat nachgewiesen, daß die Intensität der Färbungen mit Fuchsinbisulfid in hohem Maße von der Konzentration des Äthylalkoholgehaltes der Lösung abhängig ist. Die Färbung einer Flüssigkeit mit z. B. 0,3 Vol.-% Methylalkohol ist, wie aus der Kurve in Abb. 3 hervorgeht, sehr schwankend; sie ist am stärksten, wenn die Konzentration des Äthylalkohols

<sup>1</sup> Die bei der Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd in alkalischer Lösung gebildete Ameisensäure ist von R. SCHMIEDEL (Pharm. Zentralh. 1913, 54, 709) für die Bestimmung des Methylalkohols vorgeschlagen worden; nach E. DINSLAGE und O. WINDHAUSEN (Z. 1926, 52, 117) ist das Verfahren aber nicht brauchbar.

<sup>2</sup> Das von D. R. NANJİ und A. G. NORMAN (Journ. Soc. chem. Ind. 1926, 45, T 337; C. 1927, I, 1190) zur Bestimmung geringer Mengen Methylalkohol beschriebene Oxydationsverfahren mit Kaliumdichromat und Schwefelsäure, welches auf der titrimetrischen Bestimmung des nicht verbrauchten Oxydationsmittels beruht, ist natürlich nicht eindeutig, da Äthylalkohol ebenfalls durch das Oxydationsmittel angegriffen wird.

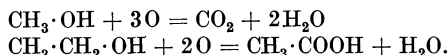
<sup>3</sup> H. JEGLINSKI: Pharm. Ztg. 1933, 78, 77.

in der Flüssigkeit 20% beträgt. Es muß daher dafür gesorgt werden, daß bei der colorimetrischen Bestimmung des Methylalkohols nach DENIGÈS - v. FELLENBURG der Äthylalkoholgehalt der Untersuchungsflüssigkeit und der Typlösungen möglichst der gleiche ist.

Außer den oben S. 991 angegebenen Autoren haben sich auch R. M. CHAPIN<sup>1</sup> sowie A. VARTAINEN und Y. JÄDERHOLM<sup>2</sup> mit dem Verfahren beschäftigt und einzelne kleine Abänderungen vorgenommen; so oxydiert ersterer mit Permanganat in phosphorsaurer Lösung und letztere wenden statt Fuchsinbisulfit Methylgrün-schweflige Säure an.

### β) Bestimmung des Methylalkohols durch Oxydation zu Kohlensäure.

Das Verfahren beruht auf der Oxydation des Methylalkohols durch Chromsäure zu Kohlensäure, während Äthylalkohol unter den gleichen Bedingungen zu Essigsäure oxydiert wird.



O. HEHNER<sup>3</sup>, NICLOUX<sup>4</sup>, TH. E. THORPE und J. HOLMES<sup>5</sup>, O. BLANK und H. FINKENBEINER<sup>6</sup>, W. KÖNIG<sup>7</sup>, A. SCHLICHT<sup>8</sup> sowie A. HEIDUSCHKA und L. WOLF<sup>9</sup> bedienen sich der Chromsäure als Oxydationsmittel und wägen die gebildete Kohlensäure. In der zu untersuchenden Lösung dürfen natürlich andere zu Kohlensäure oxydierbare organische Stoffe nicht vorhanden sein.

α) Verfahren von W. KÖNIG<sup>7</sup>. Zur Ausführung der Bestimmung dient der von J. KÖNIG<sup>10</sup> zur Bestimmung des organischen Kohlenstoffs im Wasser und der Kohlensäure in der Asche (S. 1213) vorgeschlagene Apparat. Nachdem *k*, *l*, *a* und *b* mittels Durchsaugens von kohlenstofffreier Luft von Kohlensäure befreit sind, und die gewogenen Röhren *c* und *d*, sowie das Schutzrohr *e* abgeschlossen sind, bringt man durch den Tropftrichter *t* die zu untersuchende Lösung in den Kolben *k* und spült *t* mit Wasser nach. Darauf gibt man gleichfalls durch *t* eine 15 Minuten lang ausgekochte, auf 5° abgekühlte Lösung von 30 g Kaliumbichromat in 500 ccm Wasser und 50 ccm konz. Schwefelsäure (*D* = 1,84). Nach Schließung des Hahnes *a* mischt man den Inhalt des Kolbens *k* durch Umschwenken und überläßt darauf den Apparat wenigstens 4 Stunden sich selbst. Alsdann erhitzt man den Inhalt des Kolbens vorsichtig zum Sieden und kocht 1 Stunde lang so schwach, daß die Entwicklung der Kohlensäure nur langsam und möglichst gleichmäßig erfolgt. Darauf entfernt man den Brenner, verbindet das Röhrchen *e* mit einem Aspirator und saugt nach Aufsetzen des Natron-Kalkrohres *m* auf den Trichter *t* etwa  $\frac{3}{4}$  Stunde lang erst langsam, dann etwas lebhafter Luft durch den Apparat.

Die Gewichtszunahme der U-Röhren *c* und *d* ergibt die Menge der aus dem Methylalkohol gebildeten Kohlensäure; diese ergibt, mit 0,728 multipliziert, den Gehalt an Methylalkohol.

Die Menge der zu oxydierenden Flüssigkeit ist so zu bemessen, daß sie nicht mehr als 3 g Gesamt-Alkohol und nicht mehr als etwa 1 g Methylalkohol enthält. Hat man keinen Anhalt für die Menge des letzteren, so verwendet man zunächst etwa 1 g Gesamt-Alkohol und bei Wiederholungen soviel, als etwa 0,2—1 g Methylalkohol entspricht.

<sup>1</sup> R. M. CHAPIN: Journ. Ind. Engin. chem. 1921, 13, 543; C. 1921, IV, 686.

<sup>2</sup> Y. JÄDERHOLM: Acta societatis medicorum Fennicae „Duodecim“ 1925, 6, 1; C. 1926, I, 3416.

<sup>3</sup> O. HEHNER: Analyst 1887, 12, 25.

<sup>4</sup> NICLOUX: Bull. Soc. chim. 1897, [3] 17, 839; C. 1897, I, 1257.

<sup>5</sup> TH. E. THORPE und J. HOLMES: Proc. Chem. Soc. 1903, 19, 285; C. 1904, I, 756.

<sup>6</sup> O. BLANK und H. FINKENBEINER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 1326.

<sup>7</sup> W. KÖNIG: Chem.-Ztg. 1912, 36, 1025.

<sup>8</sup> A. SCHLICHT: Zeitschr. öffentl. Chem. 1912, 18, 337.

<sup>9</sup> A. HEIDUSCHKA und L. WOLF: Pharm. Zentralh. 1920, 61, 361.

<sup>10</sup> J. KÖNIG: Z. 1901, 4, 193.

W. KÖNIG fand, in Übereinstimmung mit THORPE und HOLMES, daß bei diesem Verfahren 100 Tle. Äthylalkohol im Durchschnitt 0,5 Tle. Methylalkohol vortauschen können, eine Menge, die man in den meisten Fällen unberücksichtigt lassen kann. Will man sie berücksichtigen, so zieht man entsprechend dem obigen Verhältnis 100:0,5 den dem Äthylalkohol entsprechenden Methylalkohol von dem gefundenen Werte ab.

$\beta\beta$ ) Verfahren von A. HEIDUSCHKA und L. WOLF<sup>1</sup>. Die Oxydation des Methylalkohols zu Kohlensäure verläuft ohne Verluste (von Formaldehyd) und ihre Zeit kann wesentlich abgekürzt werden, wenn man sich der nebenstehend abgebildeten Vorrichtung (Abb. 4) bedient und, wie folgt, arbeitet:

Aus dem Gefäß *G* wird durch 10 Minuten langes Durchleiten von kohlenstofffreier Luft sämtliche Kohlensäure entfernt. Dann werden mittels eines capillaren Einfülltrichters durch das Rohr *a* 10 ccm der auf Methylalkohol zu untersuchenden Flüssigkeit, 15 ccm eisenhaltige N.-Kaliumbichromatlösung und 20 ccm 30%ige Schwefelsäure eingefüllt und die Enden der beiden Rohre zu Capillaren ausgezogen und zugeschmolzen. Das Gefäß wird im Wasserbade 1 Stunde lang erhitzt. Nach dem Erkalten wird das Ansatzrohr *b* mittels eines Capillarschlauches mit einem Chlorcalciumrohr und dieses mit einem Kaliapparat verbunden, dann das Capillarrohr an *b* abgebrochen, so daß die unter geringem Überdruck stehende aus Methylalkohol gebildete Kohlensäure in den Kaliapparat überströmen kann. Die in der Oxydationsflüssigkeit gelöste Kohlensäure wird durch Erwärmen des Gefäßes im Wasserbade und einständiges Durchleiten von kohlenstofffreier Luft durch die gerade Ansatzröhre *a* ausgetrieben. Aus der Gewichtszunahme des Kaliapparates, multipliziert mit 0,728, erhält man die Menge des oxydierten Methylalkohols.

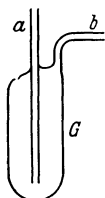


Abb. 4.  
Vorrichtung  
zur Methyl-  
alkohol-  
bestimmung  
nach  
HEIDUSCHKA  
und WOLF.

Um den bei der Oxydation verbrauchten Sauerstoff zu bestimmen, wird die gesamte Flüssigkeit aus dem Erhitzungsgefäß in einem 500 ccm-Meßkolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und der Überschuß an Kaliumbichromat in üblicher Weise mit Natriumthiosulfatlösung titriert. Ist *a* der zur Oxydation verbrauchte Sauerstoff, so berechnet sich der Methylalkoholgehalt (*x*) nach der Formel:

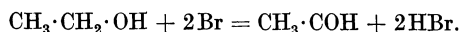
$$x = \frac{\text{CH}_3 \cdot \text{OH}}{\text{CO}_2} \cdot a = \frac{32,03}{44} \cdot a = 0,728 a.$$

### 3. Nachweis von Äthylalkohol in Methylalkohol.

Der Nachweis kann erfolgen durch die LIEBENSche Jodoformprobe (S. 1007) und durch das

#### Verfahren von G. DENIGÈS<sup>2</sup>.

Das Verfahren beruht darauf, daß Methylalkohol bei der Behandlung mit Bromwasser in der Hitze nur Spuren von Formaldehyd bildet, während Äthylalkohol unter den gleichen Bedingungen reichliche Mengen von Acetaldehyd liefert.



Man bringt in ein etwa 20 cm langes, 2,5 cm weites Reagenrohr genau 0,2 ccm des fraglichen Methylalkohols, gibt 5 ccm Bromwasser (0,3 ccm Brom auf 50 ccm Wasser) hinzu, erhitzt die Flüssigkeit im siedenden Wasserbade, bis Entfärbung eingetreten ist, höchstens jedoch 5—6 Minuten lang, kühlt in kaltem Wasser ab und entfärbt nötigenfalls durch tropfenweisen Zusatz (kein Überschuß!) von Natriumdisulfatlösung. Hierauf setzt man 5 ccm Fuchsin-disulfatlösung zu

<sup>1</sup> A. HEIDUSCHKA und L. WOLF: Pharm. Zentralh. 1920, **61**, 361.

<sup>2</sup> G. DENIGÈS: Bull. Soc. chim. France 1910, [4] **7**, 951; C. 1910, II, 1949.

und beobachtet die Flüssigkeit 5—8 Minuten lang. Beim Vorhandensein von Äthylalkohol tritt während dieser Zeit eine rote bis violettrote Färbung ein, deren Stärke der vorhandenen Äthylalkoholmenge proportional ist. Die äußerst schwache Färbung, welche reiner Methylalkohol unter diesen Bedingungen erzeugt, tritt nicht vor Ablauf von etwa 10 Minuten ein. Als Fuchsin-disulfid-lösung verwendet man am besten die LEYSche Lösung. Nachweisbar sind bis zu 1% Äthylalkohol. Es empfiehlt sich, gleichzeitig einen Leerversuch mit 0,2 ccm reinem Methylalkohol anzustellen.

Da die Gegenwart von Methylalkohol die Reaktion in der Weise begünstigt, daß der entstandene Acetaldehyd durch den Methylalkohol als Methylacetal gebunden und so vor Verflüchtigung geschützt wird, empfiehlt es sich, wenn in dem fraglichen Alkohol nur geringe Mengen Methylalkohol vorhanden sind, ihn durch die gleiche Menge (0,2 ccm) reinen Methylalkohol zu verdünnen. Falls nur höchstens 3% Äthylalkohol in dem fraglichen Alkohol vorhanden sind, verwendet man 5 ccm davon, 0,2 ccm reinen Methylalkohol und 0,03 ccm Brom und verfährt weiter wie oben. Auf diese Weise sind noch 2 mg Äthylalkohol zu erkennen.

#### 4. Bestimmung von Methyl- und Äthylalkohol in Gemischen.

Zunächst können die unter 2 aufgeführten Verfahren zur Bestimmung des Methylalkoholgehaltes in Verbindung mit der Bestimmung des Gesamt-Alkohols aus dem Spez. Gewicht auch zur Bestimmung des Äthylalkohols aus der Differenz verwendet werden.

Des weiteren sind noch folgende Verfahren anzuführen:

##### a) Refraktometrisch-aräometrische Verfahren.

Diese Verfahren beruhen darauf, daß Methyl- und Äthylalkohol ein fast gleiches Spez. Gewicht, dagegen sehr verschiedene Lichtbrechungsexponenten besitzen. Es beträgt z. B. nach W. LANGE und G. REIF

|  | Alkoholgehalt                    | Methylalkohol       | Äthylalkohol |
|--|----------------------------------|---------------------|--------------|
| Spezifisches Gewicht bei 15° . . . . . | 50 Raum-%                        | 0,9345              | 0,9347       |
|  | 100 „                            | 0,7965 <sup>1</sup> | 0,7943       |
| Refraktion { Brechungsindex . . . . .  | 100 „                            | 1,3297              | 1,3619       |
|  | Eintauch-Refraktometer . . . . . | 100 „               | 6,0 Sk.-T.   |

α) Verfahren von W. LANGE und G. REIF<sup>2</sup>. Wenn wasserfreie Mischungen von Methyl- und Äthylalkohol vorliegen, so ist eine genaue Bestimmung beider Alkohole rechnerisch ohne weiteres möglich; es braucht dann nur festgestellt zu werden, welche Refraktion das Gemisch aufweist. Da die Herstellung eines solchen wasserfreien Gemisches aber Schwierigkeiten bereitet, stellen LANGE und REIF ein Gemisch beider Alkohole mit einem bestimmten Wassergehalt her, nämlich ein solches, welches 50 Raum-% Alkohol enthält. Dieses Gemisch ist für die Bestimmung besonders geeignet, weil, wie oben gezeigt, das Spez. Gewicht bei diesem Gehalt bei beiden Alkoholen nahezu das gleiche ist.

Enthält die zu untersuchende Flüssigkeit mehr als 50 Raum-% Alkohole, so ist sie auf diesen Gehalt zu verdünnen; enthält sie weniger als 50 Raum-%, so ist sie durch Destillation mittels eines VIGREUXschen Destillationsaufsatzes entsprechend anzureichern. Für Methylalkoholgehalte unter 1% ist das Verfahren

<sup>1</sup> Nach J. GYR: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, 41, 4322. LANGE und REIF geben 0,7995 an.

<sup>2</sup> W. LANGE und G. REIF: Z. 1921, 41, 216. Auch A. E. LEACH und H. C. LYTHGOE (Journ. Amer. Chem. Soc. 1905, 27, 964) haben bereits die Refraktion zum Nachweis von Methylalkohol neben Äthylalkohol verwendet und darauf hingewiesen, daß sie sich auch zur Bestimmung des Methylalkohols eigne. Ebenso hat FR. ADAM (Arch. Chem. u. Mikrosk. 1915, 8, 20; Z. 1916, 32, 324) ein Verfahren zur schätzungsweisen Ermittlung des Methylalkohols mittels der Refraktion beschrieben.



nicht geeignet, da mit einem möglichen Fehler von mindestens 0,5% zu rechnen ist.

Die Beobachtung des Thermometers bei der Destillation gibt gewöhnlich schon einen Fingerzeig für die vorhandene Menge Methylalkohol. Bei einer 10% Methylalkohol enthaltenden Flüssigkeit z. B. gehen die ersten Tropfen Alkohol bei etwa 70° über, dann steigt das Thermometer langsam auf eine Temperatur von 76°, bei der die Hauptmenge des Alkohols überdestilliert. Bei einer 20% Methylalkohol enthaltenden Flüssigkeit beginnt die Destillation schon bei 68°. Das Wesentliche bei der Destillation ist, ganz langsam und tropfenweise den Alkohol überzutreiben; so soll die Destillation einer etwa 35% Alkohol enthaltenden Flüssigkeit mindestens 1½ Stunden dauern. Sobald das Thermometer 90° anzeigt, wird die Destillation unterbrochen. Man stellt das Destillat auf 15° ein und liest hiernach die überdestillierte Menge genau ab.

Das Spez. Gewicht der Untersuchungsflüssigkeit bzw. des Destillates wird mit Hilfe des REISCHAUERSCHEN Pyknometers bestimmt und der Alkoholgehalt nach der Alkoholtabelle von K. WINDISCH ermittelt. Aus der gefundenen Alkoholmenge ersieht man, wieviel Kubikzentimeter Wasser nach der Tabelle 4 zugesetzt werden müssen, um einen Alkohol von 50 Raum-% zu bekommen. Nachdem die Menge der so erhaltenen Flüssigkeit ermittelt worden ist, wird die Refraktometerablesung bei 17,5° vorgenommen. Aus der Tabelle 4 ergibt sich der Prozentgehalt an Methylalkohol, der durch Verdünnung der Flüssigkeit bzw. des Destillates auf 50 Raum-% Gesamt-Alkohol eingestellten Flüssigkeit und daraus unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses die Methylalkoholmenge in 100 ccm Flüssigkeit. Die Differenz gegenüber dem Gesamt-Alkoholgehalt ist der Gehalt an Äthylalkohol.

Beispiel. Wurden aus 100 ccm Flüssigkeit 79,0 ccm Destillat erhalten, dessen Spez. Gewicht 0,8820 beträgt, so entspricht diesem nach der Alkoholtabelle von K. WINDISCH ein Alkoholgehalt von 73,33 Raum-%. Nach der Verdünnungstabelle 5 sind 100 ccm eines solchen Alkohols mit 48,6 ccm Wasser, 79,0 ccm daher mit 38,4 ccm Wasser zu verdünnen, um ein Alkoholgemisch von 50 Raum-% zu erhalten. Zweckmäßig verdünnt man für die Refraktometerablesung 10 ccm des Destillates mit 4,86 ccm Wasser. Wurde beispielsweise ein Brechungsindex von 66,3 Skalenteilen, entsprechend 21,3 Raum-% Methylalkohol gefunden — d. h. 100 ccm des verdünnten Destillats enthalten 21,3% Methylalkohol —, so würde der Gehalt der ursprünglich angewandten Flüssigkeit  $\frac{(79,0 + 38,4) \cdot 21,3}{100} = 25$  Raum-% Methylalkohol betragen.

Tabelle 4. Skalenteile des Zeisschen Eintauchrefraktometers für Äthyl-Methylalkohol-Wassergemische mit einem Gesamt-Alkoholgehalt von 50 Raum-% (entsprechend dem Spez. Gewichte 0,9346 bei 15°).

| Skalen-<br>teile<br>bei 17,5° | Gehalt an<br>Methyl-<br>alkohol<br>(Raum-%) | Skalen-<br>teile<br>bei 17,5° | Gehalt an<br>Methyl-<br>alkohol<br>(Raum-%) | Skalen-<br>teile<br>bei 17,5° | Gehalt an<br>Methyl-<br>alkohol<br>(Raum-%) | Skalen-<br>teile<br>bei 17,5° | Gehalt an<br>Methyl-<br>alkohol<br>(Raum-%) | Skalen-<br>teile<br>bei 17,5° | Gehalt an<br>Methyl-<br>alkohol<br>(Raum-%) |
|-------------------------------|---|-------------------------------|---|-------------------------------|---|-------------------------------|---|-------------------------------|---|
| 84,7                          | 1   | 75,7                          | 11  | 66,6                          | 21  | 57,6                          | 31  | 48,5                          | 41  |
| 83,8                          | 2   | 74,8                          | 12  | 65,7                          | 22  | 56,7                          | 32  | 47,5                          | 42  |
| 82,8                          | 3   | 73,9                          | 13  | 64,8                          | 23  | 55,8                          | 33  | 46,6                          | 43  |
| 81,9                          | 4   | 73,0                          | 14  | 64,0                          | 24  | 54,9                          | 34  | 45,7                          | 44  |
| 81,0                          | 5   | 72,0                          | 15  | 63,0                          | 25  | 54,0                          | 35  | 44,8                          | 45  |
| 80,1                          | 6   | 71,1                          | 16  | 62,1                          | 26  | 53,0                          | 36  | 43,9                          | 46  |
| 79,2                          | 7   | 70,2                          | 17  | 61,2                          | 27  | 52,1                          | 37  | 42,9                          | 47  |
| 78,3                          | 8   | 69,3                          | 18  | 60,2                          | 28  | 51,2                          | 38  | 42,0                          | 48  |
| 77,6                          | 9   | 68,5                          | 19  | 59,3                          | 29  | 50,3                          | 39  | 41,1                          | 49  |
| 76,7                          | 10  | 67,6                          | 20  | 58,5                          | 30  | 49,4                          | 40  | 40,2                          | 50  |

β) Verfahren von E. BERL und L. RANIS<sup>1</sup>. Aus dem pyknometrisch bestimmten Spez. Gewicht bei 17,5° und dem Brechungsexponenten<sup>2</sup> bei 17,5°, mit dem

<sup>1</sup> E. BERL und L. RANIS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1927, 60, 2225.

<sup>2</sup> Die Brechungswerte sind den Tabellen zum Eintauchrefraktometer von B. WAGNER (Sondershausen 1907) entnommen und auf g in 100 g umgerechnet.

Tabelle 5. Verdünnung von Methylalkohol-Äthylalkohol-Wassergemischen mit einem geringeren Spez. Gewicht auf ein solches von 0,9346 (entsprechend 50 Raum-% bei 15°).

| Äthylalkohol<br>(Raum-%) | Auf 100 cem<br>zuzusetzendes<br>Wasser cem | Äthylalkohol<br>(Raum-%) | Auf 100 cem<br>zuzusetzendes<br>Wasser cem | Äthylalkohol<br>(Raum-%) | Auf 100 cem<br>zuzusetzendes<br>Wasser cem | Äthylalkohol<br>(Raum-%) | Auf 100 cem<br>zuzusetzendes<br>Wasser cem | Äthylalkohol<br>(Raum-%) | Auf 100 cem<br>zuzusetzendes<br>Wasser cem |
|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|
| 50,2                     | 0,4  | 59,2                     | 19,1                                       | 68,2                     | 37,9                                       | 77,2                     | 57,1                                       | 86,2                     | 76,5                                       |
| 50,4                     | 0,8  | 59,4                     | 19,6                                       | 68,4                     | 38,3                                       | 77,4                     | 57,6                                       | 86,4                     | 76,9                                       |
| 50,6                     | 1,3  | 59,6                     | 20,0                                       | 68,6                     | 38,7                                       | 77,6                     | 58,0                                       | 86,6                     | 77,4                                       |
| 50,8                     | 1,7  | 59,8                     | 20,4                                       | 68,8                     | 39,1                                       | 77,8                     | 58,4                                       | 86,8                     | 77,8                                       |
| 51,0                     | 2,1  | 60,0                     | 20,8                                       | 69,0                     | 39,6                                       | 78,0                     | 58,8                                       | 87,0                     | 78,3                                       |
| 51,2                     | 2,5  | 60,2                     | 21,2                                       | 69,2                     | 40,0                                       | 78,2                     | 59,2                                       | 87,2                     | 78,7                                       |
| 51,4                     | 2,9  | 60,4                     | 21,6                                       | 69,4                     | 40,5                                       | 78,4                     | 59,6                                       | 87,4                     | 79,1                                       |
| 51,6                     | 3,3  | 60,6                     | 22,0                                       | 69,6                     | 40,9                                       | 78,6                     | 60,0                                       | 87,6                     | 79,6                                       |
| 51,8                     | 3,7  | 60,8                     | 22,4                                       | 69,8                     | 41,4                                       | 78,8                     | 60,4                                       | 87,8                     | 80,0                                       |
| 52,0                     | 4,1  | 61,0                     | 22,8                                       | 70,0                     | 41,8                                       | 79,0                     | 60,9                                       | 88,0                     | 80,4                                       |
| 52,2                     | 4,5  | 61,2                     | 23,2                                       | 70,2                     | 42,2                                       | 79,2                     | 61,3                                       | 88,2                     | 80,8                                       |
| 52,4                     | 4,9  | 61,4                     | 23,6                                       | 70,4                     | 42,6                                       | 79,4                     | 61,8                                       | 88,4                     | 81,3                                       |
| 52,6                     | 5,4  | 61,6                     | 24,0                                       | 70,6                     | 43,0                                       | 79,6                     | 62,2                                       | 88,6                     | 81,7                                       |
| 52,8                     | 5,8  | 61,8                     | 24,4                                       | 70,8                     | 43,5                                       | 79,8                     | 62,6                                       | 88,8                     | 82,1                                       |
| 53,0                     | 6,2  | 62,0                     | 24,9                                       | 71,0                     | 43,9                                       | 80,0                     | 63,1                                       | 89,0                     | 82,5                                       |
| 53,2                     | 6,6  | 62,2                     | 25,3                                       | 71,2                     | 44,3                                       | 80,2                     | 63,5                                       | 89,2                     | 83,0                                       |
| 53,4                     | 7,0  | 62,4                     | 25,7                                       | 71,4                     | 44,7                                       | 80,4                     | 63,9                                       | 89,4                     | 83,4                                       |
| 53,6                     | 7,4  | 62,6                     | 26,1                                       | 71,6                     | 45,1                                       | 80,6                     | 64,3                                       | 89,6                     | 83,9                                       |
| 53,8                     | 7,8  | 62,8                     | 26,5                                       | 71,8                     | 45,5                                       | 80,8                     | 64,7                                       | 89,8                     | 84,3                                       |
| 54,0                     | 8,2  | 63,0                     | 27,0                                       | 72,0                     | 45,9                                       | 81,0                     | 65,2                                       | 90,0                     | 84,7                                       |
| 54,2                     | 8,6  | 63,2                     | 27,4                                       | 72,2                     | 46,3                                       | 81,2                     | 65,6                                       | 90,2                     | 85,1                                       |
| 54,4                     | 9,0  | 63,4                     | 27,8                                       | 72,4                     | 46,7                                       | 81,4                     | 66,1                                       | 90,4                     | 85,6                                       |
| 54,6                     | 9,5  | 63,6                     | 28,2                                       | 72,6                     | 47,2                                       | 81,6                     | 66,5                                       | 90,6                     | 86,0                                       |
| 54,8                     | 9,9  | 63,8                     | 28,6                                       | 72,8                     | 47,7                                       | 81,8                     | 66,9                                       | 90,8                     | 86,5                                       |
| 55,0                     | 10,4                                       | 64,0                     | 29,1                                       | 73,0                     | 48,1                                       | 82,0                     | 67,3                                       | 91,0                     | 86,9                                       |
| 55,2                     | 10,8                                       | 64,2                     | 29,5                                       | 73,2                     | 48,5                                       | 82,2                     | 67,7                                       | 91,2                     | 87,4                                       |
| 55,4                     | 11,3                                       | 64,4                     | 29,9                                       | 73,4                     | 48,9                                       | 82,4                     | 68,2                                       | 91,4                     | 87,8                                       |
| 55,6                     | 11,7                                       | 64,6                     | 30,4                                       | 73,6                     | 49,3                                       | 82,6                     | 68,6                                       | 91,6                     | 88,3                                       |
| 55,8                     | 12,1                                       | 64,8                     | 30,8                                       | 73,8                     | 49,7                                       | 82,8                     | 69,0                                       | 91,8                     | 88,7                                       |
| 56,0                     | 12,5                                       | 65,0                     | 31,3                                       | 74,0                     | 50,2                                       | 83,0                     | 69,5                                       | 92,0                     | 89,2                                       |
| 56,2                     | 12,9                                       | 65,2                     | 31,7                                       | 74,2                     | 50,6                                       | 83,2                     | 69,9                                       | 92,2                     | 89,6                                       |
| 56,4                     | 13,3                                       | 65,4                     | 32,2                                       | 74,4                     | 51,0                                       | 83,4                     | 70,4                                       | 92,4                     | 90,0                                       |
| 56,6                     | 13,7                                       | 65,6                     | 32,6                                       | 74,6                     | 51,4                                       | 83,6                     | 70,8                                       | 92,6                     | 90,5                                       |
| 56,8                     | 14,1                                       | 65,8                     | 33,0                                       | 74,8                     | 51,9                                       | 83,8                     | 71,2                                       | 92,8                     | 90,9                                       |
| 57,0                     | 14,5                                       | 66,0                     | 33,4                                       | 75,0                     | 52,4                                       | 84,0                     | 71,7                                       | 93,0                     | 91,4                                       |
| 57,2                     | 14,9                                       | 66,2                     | 33,8                                       | 75,2                     | 52,8                                       | 84,2                     | 72,1                                       | 93,2                     | 91,8                                       |
| 57,4                     | 15,4                                       | 66,4                     | 34,3                                       | 75,4                     | 53,2                                       | 84,4                     | 72,6                                       | 93,4                     | 92,3                                       |
| 57,6                     | 15,8                                       | 66,6                     | 34,7                                       | 75,6                     | 53,6                                       | 84,6                     | 73,0                                       | 93,6                     | 92,7                                       |
| 57,8                     | 16,2                                       | 66,8                     | 35,1                                       | 75,8                     | 54,1                                       | 84,8                     | 73,5                                       | 93,8                     | 93,2                                       |
| 58,0                     | 16,6                                       | 67,0                     | 35,5                                       | 76,0                     | 54,5                                       | 85,0                     | 73,9                                       | 94,0                     | 93,7                                       |
| 58,2                     | 17,1                                       | 67,2                     | 35,9                                       | 76,2                     | 54,9                                       | 85,2                     | 74,3                                       | 94,2                     | 94,1                                       |
| 58,4                     | 17,5                                       | 67,4                     | 36,3                                       | 76,4                     | 55,4                                       | 85,4                     | 74,8                                       | 94,4                     | 94,6                                       |
| 58,6                     | 17,9                                       | 67,6                     | 36,7                                       | 76,6                     | 55,9                                       | 85,6                     | 75,2                                       | 94,6                     | 95,0                                       |
| 58,8                     | 18,3                                       | 67,8                     | 37,1                                       | 76,8                     | 56,3                                       | 85,8                     | 75,6                                       | 94,8                     | 95,5                                       |
| 59,0                     | 18,7                                       | 68,0                     | 37,5                                       | 77,0                     | 56,7                                       | 86,0                     | 76,1                                       | 95,0                     | 95,9                                       |

Eintauchrefraktometer von Zeiss bestimmt, wurde ein GIBBSches Dreieck (S. 291) konstruiert, an welchem der Prozentgehalt (g in 100 g) des Dreistoffsystems Methylalkohol-Äthylalkohol-Wasser an jedem der 3 Stoffe abgelesen werden kann.

Die Ablesungen aus einem solchen Diagramm sind genauer an jenen Stellen bestimmbar, an denen die beiden Kurven nahezu senkrecht aufeinander stehen, weniger genau an den Stellen, an denen sie sich unter allzu spitzen Winkeln schneiden. Es wurden z. B. bei einem Gemisch mit 19,08% Methyl- und 46,26% Äthylalkohol nach dem Diagramm 19,2 und 46,3% gefunden, dagegen bei einem Gemisch mit 3,08% Methyl- und 2,48% Äthylalkohol nach dem Diagramm 3,8 und 2,2%. Das Verfahren eignet sich bei seiner leichten Ausführbarkeit namentlich für technische Zwecke.

### b) Elementaranalyse nach A. JUCKENACK<sup>1</sup>.

Das Verfahren beruht auf der erheblichen Differenz im Kohlenstoffgehalt der beiden Alkohole (Methylalkohol = 37,5%, Äthylalkohol = 52,18% Kohlenstoff). Bei höherer Konzentration (etwa 90%) besteht bei gleichem Spez. Gewicht kein erheblicher Unterschied im Alkoholgehalt der beiden Flüssigkeiten. Es müssen daher Proben mit niedrigem Alkoholgehalt durch Entwässern für die Elementaranalyse vorbereitet werden. Zu diesem Zweck wird die Flüssigkeit mehrmals destilliert, bis reine Wasserdämpfe übergehen. Die weitere Entwässerung erfolgt mit Hilfe von wasserfreiem Kupfersulfat bei gewöhnlicher Temperatur mit nachfolgender Destillation. Von den so erhaltenen Flüssigkeiten wird das Spez. Gewicht bestimmt und alsdann die Elementaranalyse ausgeführt, wobei jedoch lediglich der Kohlenstoffgehalt bestimmt wird. Der Gehalt an Äthylalkohol ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$x = \frac{\frac{G \cdot 100}{P} - 37,5}{0,1468},$$

in der  $x$  den gesuchten Prozentgehalt des in der Flüssigkeit enthaltenen Gesamt-Alkohols an Äthylalkohol,  $G$  den gefundenen Kohlenstoffgehalt der analysierten Flüssigkeit und  $P$  den aus dem Spez. Gewicht der analysierten Flüssigkeit berechneten Gesamt-Alkoholgehalt in Gewichtsprozenten bedeutet.

Aus den so ermittelten Werten läßt sich der Methyl- und Äthylalkoholgehalt der ursprünglichen Flüssigkeit berechnen.

Beispiel: Kohlenstoffgehalt = 37,95%. Spez. Gewicht der entwässerten Flüssigkeit bei 15° = 0,8224, demnach Alkoholgehalt nach K. WINDISCH = 90,24 Gew.-%. Folg-

lich  $x = \frac{\frac{37,95 \cdot 100}{90,24} - 37,5}{0,1468} = 31,06$  Gew.-% Äthylalkohol, und demnach 68,94 Gew.-%

Methylalkohol. Da die untersuchte Flüssigkeit 30% Alkohol (10% Äthylalkohol, 20% Methylalkohol) enthielt, wurden in ihr also 9,3% Äthylalkohol und 20,7% Methylalkohol gefunden.

### c) Oxydationsverfahren.

Über die Grundlagen dieser Verfahren s. S. 997; zu berücksichtigen ist aber, daß bei Gegenwart größerer Mengen Äthylalkohol auch geringe Mengen von diesem zu Kohlendioxyd oxydiert werden und daß diese Mengen je nach der verwendeten Schwefelsäuremenge schwanken. Die bei den verschiedenen Verfahren vorgeschriebenen Oxydationsbedingungen müssen daher genau eingehalten werden.

$\alpha$ ) Verfahren von A. HEIDUSCHKA und L. WOLF<sup>2</sup>. 40 ccm der verdünnten Alkohollösung mit etwa 0,2 g Gesamt-Alkohol, werden mit 30 ccm N.-Kaliumbichromatlösung und 40 ccm 35%iger Schwefelsäure in dem oben (S. 998) beschriebenen Gefäß 1 Stunde lang im Wasserbade erhitzt und dann weiter wie oben verfahren.

<sup>1</sup> A. JUCKENACK: Z. 1912. 24, 7.

<sup>2</sup> A. HEIDUSCHKA und L. WOLF: Pharm. Zentralh. 1920, 61, 361.

Hinsichtlich der Berechnung der Gehalte an Methyl- und Äthylalkohol ist folgendes zu beachten:

1. Wenn nur geringe Mengen Äthylalkohol vorhanden sind, so berechnet man den Methylalkohol ( $x$ ) aus der gefundenen Kohlensäure ( $a$ ) nach der bereits S. 998 angegebenen Formel I und den Äthylalkohol ( $y$ ) aus dem zur Oxydation verbrauchten Sauerstoff ( $b$ ) nach der Formel II aus den Werten

$$a = \frac{x \cdot \text{CO}_2}{\text{CH}_3\text{OH}} = 1,374 x.$$

$$x = 0,728 a. \quad (\text{I})$$

$$b = \frac{y \cdot 2\text{O}}{\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{OH}} + \frac{x \cdot 3\text{O}}{\text{CH}_3 \cdot \text{OH}} = 0,695 y + 1,50 x.$$

$$y = \frac{b - 1,50 x}{0,695}. \quad (\text{II})$$

2. Wenn größere Mengen Äthylalkohol vorhanden sind, so ist zu berücksichtigen, daß dann auch geringe Mengen (0,65%) des Äthylalkohols zu Kohlensäure oxydiert sind. Hierdurch wird eine Korrektur der Befunde für beide Alkohole erforderlich, eine Erniedrigung für den Methylalkohol und eine Erhöhung für den Äthylalkohol. Die beiden Formeln erhalten dann folgende Formen:

$$a = \frac{x \cdot \text{CO}_2}{\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{OH}} + \frac{0,0065 \cdot 2\text{CO}_2}{\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{OH}} = 1,374 x + 0,0124.$$

$$x = \frac{a - 0,0124}{1,374}. \quad (\text{I})$$

$$b = \frac{y \cdot 2\text{O}}{\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{OH}} + \frac{x \cdot 3\text{O}}{\text{CH}_3 \cdot \text{OH}} + \frac{0,0065 \cdot 2\text{CO}_2}{\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{OH}} = 0,695 y + 1,50 x + 0,090.$$

$$y = \frac{b - 1,50 x - 0,090}{0,695}. \quad (\text{II})$$

**β) Verfahren von J. MEYERFELD<sup>1</sup> und P. SZEBERENYI<sup>2</sup>.** Der zur Oxydation des Methyl- und Äthylalkohols verbrauchte Sauerstoff wird durch Titration der Chromsäure vor und nach der Oxydation des Methylalkohols zu Kohlensäure auf jodometrischem Wege mit Thiosulfatlösung ermittelt.

Man verfährt nach J. MEYERFELD, wie folgt:

10 ccm des Alkoholgemisches, enthaltend etwa 0,7 g Alkohole, werden in ein auf Zimmertemperatur abgekühltes Gemisch von 50 ccm 2 N.-Chromsäurelösung und 20 ccm reiner konz. Schwefelsäure eingetragen. Die Oxydation wird am besten in einem mit einem Trichter bedeckten, etwa 500 ccm fassenden Kolben vorgenommen, der vorher mit dem Chromsäuregemisch ausgekocht ist. Nachdem die Hauptreaktion vorüber ist, wird zum Kochen erhitzt und das Gemisch einige Zeit im Kochen gehalten. Nach dem Abkühlen wird auf 1000 ccm aufgefüllt und 50 ccm davon werden titriert. Der Titer der Chromsäure wird durch einen Leerversuch ermittelt, indem man 50 ccm 2 N.-Chromsäurelösung mit 20 ccm konz. Schwefelsäure einige Zeit zum Kochen erhitzt. Die Titration eines aliquoten Teiles der auf 1 l aufgefüllten Reaktionsflüssigkeit geschieht derart, daß man mit einer konz. wäßrigen Lösung von 3—4 g Kaliumjodid, das frei von Jodat ist, versetzt und nach kurzem Umschütteln sogleich mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung titriert. Weiterhin wird von dem zu untersuchenden Gemisch der beiden Alkohole das Spez. Gewicht pyknometrisch bei 15/15° bestimmt und dann der Gehalt an Alkohol aus der K. WINDISCHSchen Tabelle abgelesen. Hierbei wird angenommen, daß Methyl- und Äthylalkohol dasselbe Spez. Gewicht haben, was in Wirklichkeit nicht<sup>3</sup> der Fall ist.

<sup>1</sup> J. MEYERFELD: Chem.-Ztg. 1913, 37, 649.

<sup>2</sup> P. SZEBERENYI: Chem.-Ztg. 1913, 37, 757.

<sup>3</sup> Bzw. nur bis 50 Raum-% beider Alkohole der Fall ist; vgl. S. 999.

Aus folgenden Gleichungen berechnet sich dann der Gehalt an Methylalkohol ( $x$ ) und Äthylalkohol ( $y$ ):

$$x = \frac{46b - 32a}{57} \qquad y = \frac{69a - 46b}{37}.$$

Hierbei ist  $a$  das Gewicht von absolutem Methylalkohol + absolutem Äthylalkohol in Grammen,  $b$  der zur Oxydation verbrauchte Sauerstoff in Grammen.

Enthält das Gemisch kein oder nur wenig Wasser, so läßt es sich sehr genau analysieren; ist aber viel Wasser zugegen, so empfiehlt es sich, vorher durch Destillation mit einem guten Dephlegmator ein wasserarmes Gemisch der Alkohole zu bereiten. Mit diesem Verfahren hat P. SZEBERÉNYI gute Ergebnisse bei Anwesenheit verhältnismäßig geringer Mengen Methylalkohol erreicht; sind jedoch 30% und mehr davon vorhanden, so entzieht sich ein Teil des bei der Oxydation als Zwischenprodukt auftretenden Formaldehyds der weiteren Oxydation. In diesem Falle kann man den Äthylalkohol genauer bestimmen, indem man die aus ihm bei der Oxydation gebildete Essigsäure titriert, nachdem sie aus dem Oxydationsgemisch mit Wasserdampf ausgetrieben ist.

**γ) Verfahren von St. Kettle**<sup>1</sup>. Bei diesem Verfahren werden die Alkoholgemische ebenfalls mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure oxydiert. Die Destillationsprodukte: Essigsäure, Kohlendioxyd und Wasser werden in ammoniakalischer Bariumchloridlösung aufgefangen, wodurch die aus dem Äthylalkohol gebildete Essigsäure durch das Ammoniak absorbiert und das aus dem Methylalkohol gebildete Kohlendioxyd als Bariumcarbonat niedergeschlagen und nach dem Abfiltrieren bestimmt wird; aus seiner Menge errechnet sich der Gehalt an Methylalkohol. Die Essigsäure kann aus dem Filtrat vom Bariumcarbonat nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure abdestilliert und titriert werden.

**δ) Verfahren von J. Hetper**<sup>2</sup>. Dieses Verfahren oxydiert die Alkohole in alkalischer und mit Phosphorsäure angesäuertes 0,5 N.-Kaliumpermanganatlösung in der Wärme und titriert den nicht verbrauchten Anteil an dieser mit 0,5 N.-Oxalsäure zurück. In alkalischer Lösung wird der Methylalkohol ganz zu Kohlensäure und Wasser und der Äthylalkohol zu Essigsäure und Oxalsäure oxydiert, deren Mengenverhältnis von den Oxydationsbedingungen abhängt. Es wird um so mehr Essigsäure gebildet, je niedriger die Temperatur ist.

## B. Äthylalkohol.

Äthylalkohol (Äthanol),  $C_2H_5 \cdot OH$ , ist eine farblose, flüchtige, eigenartig riechende — im reinen Zustande geruchlose — brennend schmeckende, mit schwach blaßblauer Flamme brennende, neutrale Flüssigkeit vom Spez. Gewicht 0,789 (20°) — 0,7937 (15°) — und dem Siedepunkt 78,4°, die sich mit Wasser, Glycerin, Äther und Petroläther in jedem Verhältnis mischt. Absoluter Alkohol zieht beim Stehen an der Luft Wasser an.

Die Löslichkeit einiger anorganischen Stoffe in absolutem Alkohol ist folgende:

|                             |             |  |               |                |  |                             |               |
|-----------------------------|-------------|--|---------------|----------------|--|-----------------------------|---------------|
| AgNO <sub>3</sub> . . . . . | 3,0% (19°)  |  | KBr . . . . . | 0,13% (25°)    |  | NaBr . . . . .              | 2,16% (19,5°) |
| CoCl <sub>2</sub> . . . . . | 36,0% (15°) |  | KCl . . . . . | 0,034% (18,5°) |  | NaCl . . . . .              | 0,09% (17°)   |
| HgBr <sub>2</sub> . . . . . | 23,1% (25°) |  | KJ . . . . .  | 1,83% (17°)    |  | NaJ . . . . .               | 30,1% (22,5°) |
| HgCl <sub>2</sub> . . . . . | 32,2% (20°) |  | KCN . . . . . | 0,87% (19,5°)  |  | ZnCl <sub>2</sub> . . . . . | 33,3% (15,5°) |

% = Prozentgehalt der Lösung (Temperatur).

### Handelssorten.

Der Alkoholgehalt des von mittleren und größeren Brennereien an die Deutsche Monopolverwaltung gelieferten „Rohsprits“ soll mindestens 80 Gew.-% betragen. Die Monopolverwaltung bringt 5 Arten „Feinsprit“ mit 92,4—94,6 Gew.-% Alkohol in den Handel, nämlich Extra fein filtrierten Spirit,

<sup>1</sup> ST. KETTLE: Chemist-Analyst 1929, 18, 7; C. 1929, II, 197.

<sup>2</sup> J. HETPER: Z. 1912, 24, 731 u. 1913, 26, 342; vgl. ferner Zeitschr. analyt. Chem. 1911, 50, 343; 1912, 51, 407.

Feinfiltrierten Sprit (früher als Weinsprit bezeichnet), Prima-Sprit, Sprit für technische Zwecke und Absoluten Alkohol. Der Prima-Sprit ist für die Herstellung von Trinkbranntweinen bestimmt.

Das Deutsche Arzneibuch (6. Ausgabe 1926) unterscheidet „Absoluten Alkohol“, „Weingeist“ und „Verdünnten Weingeist“ und stellt hinsichtlich des Gehaltes folgende Anforderungen:

|                       |         |                     |                    |
|-----------------------|---------|---------------------|--------------------|
| Absoluter Alkohol:    | Gehalt: | 99,66—99,46 Vol.-%, | 99,44—99,11 Gew.-% |
| Weingeist:            | „       | 91,29—90,09 „       | 87,35—85,80 „      |
| Verdünnter Weingeist: | „       | 69—68 „             | 61—60 „            |

#### a) Anforderungen an die Reinheit von absolutem Alkohol und Feinsprit.

Der in den Brennereien gewonnene „Rohsprit“ enthält als regelmäßige Beimengungen in erster Linie Aldehyde (Acet-, Meta-, Para- und Crotonaldehyd), Fettsäuren (Essigsäure, Buttersäure, Capron- und Caprylsäure), höhere Alkohole (Propyl-, Isobutyl- und Amylalkohol) und Ester (der Ameisen-, Essig-, Butter- und Caprinsäure), ferner Furfurol, Aminbasen, letztere besonders im Melassesprit.

Hier mögen nur einige Prüfungen mitgeteilt werden, denen nach dem Deutschen Arzneibuch (6. Ausgabe 1926) und nach E. MERCK'S „Prüfung der Reagenzien auf Reinheit“<sup>1</sup> Absoluter Alkohol und Feinsprit genügen sollen.

1. Prüfung auf Säure. Alkohol darf Lackmuspapier nicht verändern. 25 ccm Alkohol dürfen bei Anwendung von Phenolphthalein als Indicator nicht mehr als 0,1 ccm 0,1 N.-Kalilauge bis zur bleibenden Rotfärbung verbrauchen.

2. Prüfung auf Rückstand. 50 ccm Alkohol dürfen nach langsamem Verdunsten keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

3. Prüfung auf Fuselöl. Verreibt man einige Tropfen Alkohol zwischen den Händen, so soll sich kein unangenehmer Geruch bemerkbar machen. — Mischt man 10 ccm Alkohol und 30 ccm Wasser in einem ERLÉNMEYER-Kölbchen, so darf keine Trübung oder Färbung und kein fremdartiger Geruch bemerkbar sein. — Dampft man eine Mischung aus 10 ccm Alkohol und 0,2 ccm Kalilauge (15%) auf 1 ccm ein und übersättigt dann mit verd. Schwefelsäure, so darf kein Geruch nach Fuselöl auftreten. — Werden 5 ccm Alkohol mit 5 ccm Wasser verdünnt, mit 25—30 Tropfen einer alkoholischen Salicylaldehydlösung (1:100) und mit 20 ccm konz. Schwefelsäure versetzt, so darf die Mischung nach dem Erkalten keine rötliche oder granatrote Färbung zeigen.

4. Prüfung auf Aldehyde. Eine Mischung von 10 ccm Alkohol, 10 ccm Wasser und 2 ccm ammoniakalischer Silberlösung darf sich bei Lichtabschluß innerhalb 15 Stunden weder färben noch trüben.

5. Prüfung auf Aceton. Wird ein Gemisch von 6 ccm Barytwasser und 6 Tropfen Quecksilberchloridlösung (1:20) mit 2 ccm Alkohol 1 Minute lang geschüttelt und filtriert, so darf das klare Filtrat nach Zusatz von Schwefelammoniumlösung eine dunkle Farbe nicht annehmen. 5 ccm Alkohol werden in einem 50 ccm fassenden Kölbchen, welches mit einem zweimal rechtwinklig gebogenen, ungefähr 75 cm langen Glasrohr und einer Vorlage verbunden ist, mit kleiner Flamme vorsichtig erhitzt, bis etwa 1 ccm Destillat übergegangen ist. Auf Zusatz der gleichen Menge Natronlauge und 5 Tropfen Nitroprussidnatriumlösung darf eine Rotfärbung, die nach vorsichtigem Übersättigen der Flüssigkeit mit Essigsäure in Violett übergeht, nicht auftreten.

6. Prüfung auf Furfurol. Eine Mischung von 10 ccm Alkohol, 1 Tropfen Anilin und 5 Tropfen verd. Essigsäure (1,040—1,042) darf innerhalb 1 Stunde keine rote Farbe annehmen.

7. Prüfung auf Kaliumpermanganat reduzierende Verunreinigungen. Die rote Färbung einer Mischung von 10 ccm Alkohol und 1 Tropfen Kaliumpermanganatlösung (1:1000) darf innerhalb 10 Minuten bei etwa 18° nicht in Gelb übergehen.

8. Prüfung auf Melasse-Spiritus. Überschichtet man 5 ccm konz. Schwefelsäure mit 5 ccm Alkohol, so darf an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten innerhalb 1 Stunde keine rosarote Zone entstehen.

9. Prüfung auf Gerbstoff und Metalle. Versetzt man 10 ccm Alkohol mit 1 ccm Ammoniaklösung (0,960) oder mit 5 ccm Schwefelwasserstoffwasser, so darf keine Färbung eintreten.

<sup>1</sup> Vgl. E. MERCK: Prüfung der Reagenzien auf Reinheit, 1931, 7.

10. Prüfung auf Methylalkohol. 20 ccm Absoluter Alkohol werden in ein Kölbchen von etwa 100 ccm Inhalt gegeben, das mit einem zweimal rechtwinklig gebogenen, ungefähr 75 cm langen Glasrohr verbunden ist. Das Glasrohr mündet in einen kleinen Meßzylinder. Hierauf wird mit kleiner Flamme vorsichtig erhitzt, bis 2 ccm Destillat übergegangen sind. 1 ccm des Destillats wird mit 4 ccm verd. Schwefelsäure (15,6—16,3%) gemischt und unter guter Kühlung und stetem Umschütteln nach und nach mit 1 g fein zerriebenem Kaliumpermanganat versetzt. Sobald die Violettfärbung verschwunden ist, wird durch ein kleines, trockenes Filter filtriert und das meist schwach rötlich gefärbte Filtrat einige Sekunden lang gelinde erwärmt, bis es farblos geworden ist. Nach dem Erkalten gibt man aus einer Pipette 3—5 Tropfen dieser Flüssigkeit zu 0,5 ccm einer frisch bereiteten und gut gekühlten Lösung von 0,02 g Guajacol in 10 ccm Schwefelsäure, die sich auf einem auf weißer Unterlage ruhenden Uhrglas befindet, indem man dabei die Ausflußöffnung der Pipette der Oberfläche der Guajacol-Lösung soweit als möglich nähert. Hierbei darf innerhalb 2 Minuten keine rosarote Färbung auftreten.

### b) Nachweis von vergälltem Alkohol.

Um den für Trinkzwecke mit einem hohen Inlandzoll belegten „Branntwein“ genußunbrauchbar zu machen und technischen Zwecken zum ermäßigten Preise zuzuführen, wird solcher Branntwein vergällt (denaturiert). Als Vergällungsmittel werden je nach dem Verwendungszweck die verschiedensten Stoffe<sup>1</sup> verwendet. Die allgemeine Vergällung besteht in einem Zusatz von 2% Holzgeist und 1% Pyridinbasengemisch.

Da der Nachweis von Methylalkohol und Aceton an anderer Stelle eingehend behandelt wird, möge hier kurz der Nachweis von Pyridinbasen nach den „Technischen Bestimmungen“<sup>2</sup> wiedergegeben werden.

Von 300 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden nach Zusatz von 30 ccm N.-Schwefelsäure etwa 150 ccm abdestilliert und zur Prüfung auf Methylalkohol (S. 990) und Aceton (S. 1058) verwandt; der Destillationsrückstand dient zur Prüfung auf Pyridinbasen. Er wird in einer Schale auf dem Wasserbade bis auf etwa 10 ccm oder bei hohem Extraktgehalt bis zur Dickflüssigkeit eingengt, in einen kleinen Rundkolben übergespült und mit 20 ccm Natronlauge ( $D = 1,17$ ) versetzt. Man treibt unter Verwendung eines Kugelaufsatzes und eines Vorstoßes, dessen Ende in eine mit 5 ccm N.-Schwefelsäure beschickte Vorlage eintaucht, etwa die Hälfte des Kolbeninhaltes über. Das Destillat wird in einer Schale auf dem Wasserbade bis auf etwa 5 ccm eingengt. Nach dem Erkalten wird durch Zugabe von 0,5 g Calciumcarbonat der Schwefelsäuregehalt abgestumpft. Pyridinbasen machen sich hierbei schon durch den Geruch bemerkbar. Der Schaleninhalt wird abgesaugt, der klare Filterablauf zunächst mit 0,3 ccm Bariumchloridlösung (10 g in 100 g) versetzt und der entstandene Niederschlag durch ein gehärtetes Filter abfiltriert. Nachdem durch Zusatz eines Tropfens Bariumchloridlösung zum Filterablauf die völlige Ausfällung der Schwefelsäure festgestellt ist, werden 5 Tropfen Cadmiumchloridlösung (70 g kryst. Cadmiumchlorid in 100 g) zugefügt. Waren in der Probe Pyridinbasen vorhanden, so entstehen, bisweilen erst nach 2—3 Tagen, Krystalle von Pyridincadmiumchlorid. Diese erscheinen unter dem Mikroskop bei etwa 60—100facher Vergrößerung als spießige, stern- oder ährenförmig gruppierte Nadeln. Beim Erwärmen einer Probe der abfiltrierten Krystalle mit einem Tropfen Natronlauge tritt der Geruch nach Pyridinbasen auf.

Zweckmäßig werden Vergleichsversuche mit Lösungen von bekanntem Pyridingehalt, beispielsweise 1 auf 500 und 1 auf 1000 angestellt.

<sup>1</sup> Als Vergällungsmittel werden außer Holzgeist und Pyridinbasen unter anderem je nach dem Verwendungszweck verwendet: Terpentinöl, Tieröl, Toluol, Benzol, Benzin, Äthyläther, Kali- oder Natronlauge, Carbonsäure, Essigsäure, Phtalsäurediäthylester, Ricinusöl, Lavendelöl, Rosmarinöl, Schellack, Kolophonium, Benzoe- oder Sandarakharz usw. Vorschriften über die an diese Vergällungsmittel zu stellenden Anforderungen und deren Untersuchung auf vorschriftsmäßige Beschaffenheit sind in den „Technischen Bestimmungen“ gegeben.

<sup>2</sup> Technische Bestimmungen zu den Ausführungsbestimmungen zum Gesetz über das Branntweinmonopol vom 8. April 1922. Herausgegeben vom Reichsmonopolamt für Branntwein 1933. — Zu beziehen durch R. v. Deckers Verlag (G. Schenck) in Berlin W 9, Linkstr. 35.

## 1. Nachweis des Äthylalkohols.

### a) Jodoformreaktion.

Die von LIEBEN<sup>1</sup> herrührende Jodoformreaktion auf Alkohol ist sehr empfindlich und wird vielfach angewendet; es ist aber zu beachten, daß sie nicht nur mit Äthylalkohol, sondern auch mit Aceton, Essigsäureäthylester, Äthyläther, Acetaldehyd und überhaupt mit allen Verbindungen, welche eine  $\text{CH}_3 \cdot \text{COOH} \cdot \text{C}$ - oder  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{C}$ -Gruppe enthalten, eintritt. Methylalkohol dagegen gibt die Jodoformreaktion nicht.

$\alpha$ ) Nach LIEBEN wird die zu untersuchende Flüssigkeit mit verd. Kalilauge stark alkalisch gemacht, auf  $50\text{--}60^\circ$  erwärmt und dann unter beständigem Umschütteln so lange mit einer verd. Auflösung von Jod in Kaliumjodid versetzt, bis die Flüssigkeit gelb gefärbt bleibt. Alsbald tritt selbst bei nur geringen Mengen Äthylalkohol (1:1000) der eigenartige Geruch des Jodoforms auf, das sich nach längerem Stehen als kleine gelbe Flitter, die unter dem Mikroskop als sechsseitige und sternförmig gruppierte Tafelchen erscheinen und bei  $120^\circ$  schmelzen, am Boden absetzt.

$\beta$ ) Nach R. KUNZ<sup>2</sup>. Eine sehr empfindliche, rasch und sicher eintretende Jodoformreaktion erfolgt, wenn man 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit in einem Versuchsröhrchen nach Zusatz von 1,5—2 ccm Natronlauge (1:10), etwa 0,15 g Kaliumjodid und 0,2 g Kaliumpersulfat auf  $50\text{--}60^\circ$  erwärmt.

Enthalten die 10 ccm der Versuchsflüssigkeit 1 Tropfen Äthylalkohol, so entsteht schon nach 1 Minute ein Jodoformniederschlag; ist 1 Tropfen Alkohol in 50 ccm enthalten, so zeigt sich nach 5 Minuten ein Niederschlag und bei 1 Tropfen Alkohol in 100 ccm tritt nach 10 Minuten eine Jodoformtrübung ein.

$\gamma$ ) Nach I. M. KOLTHOFF<sup>3</sup>. Zu 10 ccm Flüssigkeit setzt man 0,1 g Kaliumjodid, 0,1 g Chloramin (HEYDEN) und 10—20 Tropfen 4 N.-Natronlauge hinzu, schüttelt um, erwärmt auf  $60^\circ$  und läßt stehen. Je nach der Menge des vorhandenen Alkohols scheidet sich schnell oder langsam Jodoform aus, nämlich bei:

|                             |     |     |     |      |        |
|-----------------------------|-----|-----|-----|------|--------|
| Alkohol-Konzentration . . . | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,05 | 0,025% |
| Nach Minuten . . . . .      | 1   | 10  | 10  | 15   | 60     |

Das Jodoform scheidet sich bei dieser Ausführungsart in amorpher ziegelroter Form aus, die beim Umkrystallisieren aus Alkohol in die gelbe Form übergeht. Die Reaktion ist auch sehr empfindlich auf Aceton; 2 mg im Liter erzeugen ohne Erwärmung nach 10 Minuten einen gelben Jodoformniederschlag.

L. ROSENTHALER<sup>4</sup> weist darauf hin, daß Isopropylalkohol eine stärkere Jodoformreaktion gibt als Äthylalkohol.

### b) Esterreaktionen.

Der Äthylalkohol kann auch durch seine Essigsäure- oder Benzoesäureester (BERTHELOT<sup>5</sup>) nachgewiesen werden, die charakteristische Gerüche besitzen. Über ihre sowie die Darstellung weiterer kennzeichnender Ester s. S. 977 und über die Schmelzpunkte der letzteren die Tabelle auf S. 978.

### c) Farbenreaktionen.

Über die Zuverlässigkeit der Farbenreaktionen auf Alkohole vgl. S. 981.

$\alpha$ ) Reaktion von A. TONINELLI<sup>6</sup>. Diese Farbenreaktion beruht auf der Einwirkung von Dinitrotoluollösung in Äther-Schwefelkohlenstoff- und ätherischer Jodlösung in

<sup>1</sup> LIEBEN: Ann. Chem. u. Pharm. 1870, 7, 377.

<sup>2</sup> R. KUNZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1920, 59, 302.

<sup>3</sup> I. M. KOLTHOFF: Pharm. Weekbl. 1925, 62, 652.

<sup>4</sup> L. ROSENTHALER: Pharm. Ztg. 1931, 76, 775.

<sup>5</sup> BERTHELOT: Compt. rend. Paris 1871, 73, 496.

<sup>6</sup> A. TONINELLI: Ann. Chim. analyt. appl. 19, 169; C. 1914, II, 85.



alkalischer Lösung. Äthylalkohol liefert rosa bis granatrote Färbungen. Methylalkohol und Aceton stören die Reaktion nicht, wohl aber größere Mengen von Wasser und Aldehyd. Höhere Alkohole, die die Reaktion ebenfalls geben, müssen vor ihrer Anstellung durch ein Ausschüttelungs- und Destillationsverfahren beseitigt werden.

β) Reaktion von J. KÓSSA<sup>1</sup>. Bei der Einwirkung von 1 Tropfen 90%igem Alkohol auf 20 ccm 50%ige Salpetersäure in der Kälte tritt eine grüne Färbung ein. Aldehyde, Aceton, Äther und Chloroform geben die Reaktion nicht.

γ) Reaktion von D. VITALI<sup>2</sup>. Versetzt man die auf Alkohol zu prüfende Flüssigkeit mit Schwefelkohlenstoff, Ätzkali, Ammoniummolybdat und überschüssiger verd. Schwefelsäure, so entsteht bei Anwesenheit von Äthylalkohol eine Rotfärbung (Bildung von Molybdänxanthogenat).

δ) Reaktion von L. EKKERT<sup>3</sup>. Mit Resorcin und konz. Schwefelsäure entsteht Rotfärbung; eine ähnliche Färbung gibt Methylalkohol, während die höheren Alkohole rotbraune Färbungen geben. Ähnliche Färbungen entstehen mit Phenol, Guajacol und Pyrogallol.

d) Über den Nachweis von Äthylalkohol in Methylalkohol s. S. 998.

## 2. Bestimmung des Äthylalkohols.

Die einfachsten und zuverlässigsten Methoden zur Bestimmung des Alkoholgehaltes in reinen wäßrigen Äthylalkohollösungen beruhen auf der Bestimmung des Spez. Gewichtes oder der Refraktion der Lösungen bei einer bestimmten Temperatur.

Sind in einer zu untersuchenden Flüssigkeit neben dem Alkohol nichtflüchtige Stoffe vorhanden, so destilliert man unter guter Kühlung aus einer abgemessenen oder abgewogenen Menge der Flüssigkeit nach Zusatz von etwa der halben Menge Wasser den Alkohol langsam ab und füllt das Destillat auf das angewendete Volumen oder das angewendete Gewicht der zu untersuchenden Flüssigkeit mit Wasser auf. — Zu beachten ist hierbei, daß bei der Destillation hochprozentiger alkoholischer Flüssigkeiten Verluste an Alkohol entstehen können, wenn im Anfange nicht sehr langsam destilliert und das vorgelegte Gefäß (Pyknometer) nicht hinreichend in möglichst kaltem Wasser gekühlt wird und der feinausgezogene Destillationsvorstoß nicht bis auf den Boden reicht<sup>4</sup>.

Sind in der Flüssigkeit neben nichtflüchtigen Stoffen auch flüchtige Säuren vorhanden, so ist die Flüssigkeit vor der Destillation schwach alkalisch zu machen. Sind außer Säuren noch andere flüchtige Stoffe (Ester, Aldehyde, ätherische Öle u. a.) vorhanden, so ist nach besonderen Verfahren zu arbeiten.

Sind neben Äthylalkohol noch andere Alkohole oder sonstige flüchtige Stoffe vorhanden, so kommen die Bestimmung des Äthylalkohols als Jodoform (S. 1011) und die Oxydationsverfahren (S. 1011) zur Anwendung.

### a) Bestimmung aus dem Spezifischen Gewicht.

Die Bestimmung des Spez. Gewichtes erfolgt im Laboratorium entweder nach der Pyknometermethode (S. 7) oder mittels der hydrostatischen Waage (S. 10), während man sich in der Technik meist der aräometrischen Methode (Alkoholometer) bedient. Bei der Bestimmung des Alkoholgehaltes ist zu berücksichtigen, daß beim Mischen von Äthylalkohol und Wasser eine Kontraktion stattfindet, die wie die nachfolgende Tabelle 6 zeigt, bei etwa 50 Raum-% Alkohol am größten ist.

Berechnung des Alkoholgehaltes. Aus dem Spez. Gewicht der alkoholischen Lösung berechnet man den Alkoholgehalt entweder in Gewichtsprozenten (g in 100 g) oder in Raumprozenten (ccm in 100 ccm) oder in g in 100 oder 1000 ccm.

<sup>1</sup> J. KÓSSA: Pharm. Zentralh. 1905, 46, 893.

<sup>2</sup> D. VITALI: MERCK'S Reagenzien-Verzeichnis 1929, 611.

<sup>3</sup> L. EKKERT: Pharm. Zentralh. 1928, 69, 198.

<sup>4</sup> Siehe E. FEDER u. L. RATH: Z. 1926, 52, 292 sowie C. AMBERGER: Z. 1928, 55, 447.

Bislang hat man sich zur Berechnung des Alkoholgehaltes aus dem Spez. Gewicht in Deutschland allgemein der Alkoholtabelle von K. WINDISCH<sup>1</sup> (Tabelle VIIIA im Anhang) bedient. In dieser Tabelle sind die Spez. Gewichte bei 15° auf Wasser von gleichfalls 15° bezogen.

Tabelle 6. Alkohol- und Wassergehalt in Mischungen beider und die beim Mischen stattfindende Kontraktion<sup>2</sup>.

| Spez. Gewicht<br>15°<br>15° | 100 ccm enthalten |               | Kontraktion<br>ccm | Spez. Gewicht<br>15°<br>15° | 100 ccm enthalten |               | Kontraktion<br>ccm |
|-----------------------------|-------------------|---------------|--------------------|-----------------------------|-------------------|---------------|--------------------|
|                             | Alkohol<br>ccm    | Wasser<br>ccm |                    |                             | Alkohol<br>ccm    | Wasser<br>ccm |                    |
| 0,9985                      | 1                 | 99,055        | 0,055              | 0,9592                      | 35                | 68,109        | 3,109              |
| 0,9970                      | 2                 | 98,111        | 0,111              | 0,9519                      | 40                | 63,406        | 3,406              |
| 0,9956                      | 3                 | 97,176        | 0,176              | 0,9435                      | 45                | 58,593        | 3,593              |
| 0,9942                      | 4                 | 96,242        | 0,242              | 0,9343                      | 50                | 53,700        | 3,717              |
| 0,9928                      | 5                 | 95,307        | 0,307              | 0,9242                      | 55                | 48,717        | 3,700              |
| 0,9915                      | 6                 | 94,382        | 0,382              | 0,9134                      | 60                | 43,664        | 3,664              |
| 0,9902                      | 7                 | 93,458        | 0,458              | 0,9021                      | 65                | 38,561        | 3,561              |
| 0,9890                      | 8                 | 92,543        | 0,543              | 0,8900                      | 70                | 33,378        | 3,378              |
| 0,9878                      | 9                 | 91,629        | 0,629              | 0,8773                      | 75                | 28,135        | 3,135              |
| 0,9866                      | 10                | 90,714        | 0,714              | 0,8639                      | 80                | 22,822        | 2,822              |
| 0,9811                      | 15                | 86,191        | 1,191              | 0,8496                      | 85                | 17,419        | 2,419              |
| 0,9760                      | 20                | 81,708        | 1,708              | 0,8339                      | 90                | 11,876        | 1,876              |
| 0,9709                      | 25                | 77,225        | 2,225              | 0,8164                      | 95                | 6,153         | 1,153              |
| 0,9655                      | 30                | 72,712        | 2,712              | 0,7995                      | 99                | 1,285         | 0,285              |

In Deutschland ist inzwischen durch die Verordnung vom 21. Dezember 1927<sup>3</sup> der § 138 der Eichordnung dahin abgeändert, daß der Rauminhalt von Meßgeräten (Pyknometern, Büretten, Pipetten usw.) bei 20° ihrem Nennwert zu entsprechen hat und dementsprechend Meßgeräte seit 1. Januar 1929 nur noch für die Temperatur von 20°, bezogen auf Wasser von 4°, geeicht werden dürfen. Die Beobachtungstemperatur von 20° hat sich auch sonst bei wissenschaftlichen Arbeiten immer mehr eingebürgert. Es empfiehlt sich daher in Zukunft im Laboratorium alle Bestimmungen des Spez. Gewichtes — soweit nicht andere Maßtemperaturen in Untersuchungsmethoden ausdrücklich vorgeschrieben sind — bei 20° auszuführen und die zu ermittelnden Alkoholgehalte auf  $d_{4^{\circ}}^{20^{\circ}}$  zu beziehen. Es wird daher auch in Zukunft häufiger eine Umrechnung der bisher in der verschiedensten Weise ermittelten Spez. Gewichte, insbesondere der bei  $\frac{15^{\circ}}{15^{\circ}}$  bestimmten, auf solche von  $\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}$  erforderlich werden.

Als Grundlage für diese Umrechnung auf  $d_{4^{\circ}}^{20^{\circ}}$  dient die „Amtliche Tafel der Reichsanstalt für Maß und Gewicht“<sup>4</sup>. Die darin angegebenen Werte für  $d_{15^{\circ}}^{20^{\circ}}$  werden zunächst auf  $d_{4^{\circ}}^{20^{\circ}}$  umgerechnet nach der Gleichung:

$$d_{4^{\circ}}^{20^{\circ}} = \frac{d_{15^{\circ}}^{20^{\circ}}}{1,00084} = d_{15^{\circ}}^{20^{\circ}} \times 0,99916.$$

1,00084 ist  $d_{15^{\circ}}^{4^{\circ}}$  des Wassers bei 4° nach der „Amtlichen Tafel der Reichsanstalt für Maß und Gewicht“ und 0,99916 der reziproke Wert davon.

<sup>1</sup> K. WINDISCH: Tafel zur Ermittlung des Alkoholgehaltes von Alkohol-Wassermischungen aus dem Spez. Gewicht. Nach den von der Kaiserl. Normal-Eichungskommission angenommenen Zahlen berechnet. Berlin: Julius Springer 1893.

<sup>2</sup> Vgl. Post's Chem. techn. Analyse 1907, 2, 591.

<sup>3</sup> Verordnung, betr. Änderung und Ergänzung der Eichordnung. Reichsgesetzbl. I 1927, 503.

<sup>4</sup> Mitt. d. Reichsanstalt für Maß und Gewicht 1921, 5. Reihe, Nr. 7, S. 88.

Die g Alkohol in 100 ccm (g/100 ccm) berechnet man nach der Gleichung:

$$g/100 \text{ ccm} = g/100 \text{ g} \times d_{\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}}$$

und die Raum-% Alkohol (ccm/100 ccm) nach der Gleichung:

$$\text{ccm}/100 \text{ ccm} = \frac{g/100 \text{ ccm}}{0,78942} = g/100 \text{ ccm} \times 1,2668.$$

Die Raum-% Alkohol (ccm/100 ccm) können auch unmittelbar aus den Gew.-% berechnet werden nach der Gleichung:

$$\text{ccm}/100 \text{ ccm} = \frac{g/100 \text{ g} \times d_{\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}}}{0,78942} = g/100 \text{ g} \times d_{\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}} \times 1,2668.$$

0,78942 ist das Spez. Gewicht  $d_{\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}}$  des absoluten Alkohols und 1,2668 der reziproke Wert davon.

Um solcher umständlichen Berechnungen in der Praxis überhoben zu sein, hat J. GROSSFELD eine neue Alkoholtabelle für  $\frac{20^{\circ}}{4^{\circ}}$  (Tabelle VIII B im Anhang) berechnet und darin die den wahren Dichten von Alkohol-Wasser-Mischungen entsprechenden Gewichts- und Raumprozenten sowie die g Alkohol in 1000 ccm angegeben.

Sind in der Flüssigkeit, deren Alkoholgehalt man bestimmen will, neben dem Alkohol nichtflüchtige Stoffe vorhanden, so wird in der oben (S. 1008) angegebenen Weise der Alkohol abdestilliert, und je nach der Art und Weise, wie man den Alkoholgehalt der Flüssigkeit ausdrücken will, schlägt man hierbei, um jede Umrechnung zu vermeiden, zweckmäßig folgende Wege ein:

1. Soll der Alkoholgehalt in Raum-% ausgedrückt werden, so destilliert man von Raum zu Raum, d. h. man mißt bestimmte ccm der Flüssigkeit ab, füllt das Destillat auf die gleichen ccm mit Wasser auf und bestimmt das Spez. Gewicht. Die sich daraus ergebenden Raum-% Alkohol stellen unmittelbar auch die Raum-% der Flüssigkeit dar.

2. Soll der Alkoholgehalt in g für 100 ccm ausgedrückt werden, so destilliert man ebenfalls von Raum zu Raum, bestimmt das Spez. Gewicht des Destillates. Der sich daraus ergebende Gehalt an g Alkohol in 100 ccm ist auch der Gehalt der Flüssigkeit daran.

3. Soll der Alkoholgehalt in Gew.-% ausgedrückt werden, so destilliert man von Gewicht zu Gewicht, d. h. man wägt eine bestimmte Gewichtsmenge ab, füllt das Destillat mit Wasser auf die gleiche Gewichtsmenge auf und bestimmt das Spez. Gewicht. Die sich daraus ergebenden Gew.-% Alkohol stellen unmittelbar auch die Gew.-% Alkohol der Flüssigkeit dar.

### Aräometrische Bestimmung des Alkohols.

Die in der Technik und für Zwecke der Besteuerung verwendeten, von der Normal-Eichungskommission kontrollierten „Normal-Alkoholometer“ zeigen seit der amtlichen Vorschrift vom 1. Juli 1889<sup>1</sup> den Alkoholgehalt in Gew.-%  $d_{\left(\frac{15^{\circ}}{15^{\circ}}\right)}$  an. Die Bestimmungen mittels des Alkoholometers müssen daher bei 15° ausgeführt werden. Seinen Angaben liegt das Spez. Gewicht  $d_{\frac{15^{\circ}}{15^{\circ}}}$  des reinen Äthylalkohols von 0,79425 zugrunde.

Ist die Bestimmung bei einer von 15° abweichenden Temperatur erfolgt, so erhält man die sog. „scheinbare Stärke“ an Alkohol, die natürlich bei Meßtemperaturen über 15° größer und bei solchen unter 15° kleiner ist als die „wahre Stärke“. Den geeichten Normal-Alkoholometern sind Reduktionstabellen beigelegt, aus denen man die der „scheinbaren Stärke“ entsprechende „wahre Stärke“ unmittelbar ablesen kann.

Bei Messungen mit den Alkoholometern sind die bekannten Vorschriften aräometrischer Messungen zu beachten, insbesondere bei der Ablesung die richtige Stellung des Auges —

<sup>1</sup> Vor dieser Zeit fanden auch in Deutschland die Alkoholtafeln von O. HEHNER (Wiesbaden: C. W. Kreidel 1880) Verwendung, die sich auf eine Normal-Temperatur von 60° F (= 15,5° C) bezogen, und die „Volumprozent nach TRALLES“ darstellten. Die Angabe der Vergleichswerte zwischen Gew.-% bei 15° und Vol.-% bei 15,5° erscheint heute nicht mehr erforderlich.

dicht unterhalb des Flüssigkeitsspiegels —, wobei die um die Spindel gebildete Flüssigkeitserhöhung zu einer nahezu geraden Linie zusammengedrängt erscheint.

### b) Refraktometrische Bestimmung.

In reinen wäßrigen Äthylalkohollösungen kann man den Gehalt an Äthylalkohol refraktometrisch bestimmen, indem man die Refraktion mit dem Zeisschen Eintauchrefraktometer bei 17,5° bestimmt und die zugehörigen Gewichtsprocente<sup>1</sup> aus der von A. BECKEL<sup>2</sup> und K. SENNEWALD<sup>3</sup> verbesserten WAGNERSchen Tabelle<sup>4</sup> (Tabelle IX im Anhang) abliest. K. SENNEWALD hat eine Umrechnungstabelle für die Refraktionen bei 10—30° auf solche von 17,5° aufgestellt. Zu beachten ist hierbei, daß die Skalenteile 93,35—103,46 des Eintauchrefraktometers doppelten Werten entsprechen. Um festzustellen, ob Äthylalkohol von hohem oder niedrigem Prozentgehalt vorliegt, verdünnt man ihn mit Wasser auf das doppelte Volumen und bestimmt nochmals die Refraktion. Der so gefundene Wert ergibt verdoppelt den wirklichen Gehalt an Gewichtsprozenten Alkohol an.

Die der Tabelle IX (im Anhang) nachgefügte Umrechnungstabelle von K. SENNEWALD gestattet die Umrechnung von bei 10—30° abgelesenen Skalenteilen auf die Normaltemperatur 17,5°.

### c) Bestimmung als Jodoform.

VILLEDIEU und HÉBERT<sup>5</sup> haben die Jodoformprobe nach LIEBEN (S. 1007) zu einer Bestimmungsmethode des Äthylalkohols in sehr verdünnten Lösungen ausgearbeitet. Man verfährt folgendermaßen: 100 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden mit einer Mischung von gleichen Raumteilen Natronlauge (Spez. Gewicht 1,35) und Wasser versetzt, dann vorsichtig, zum Schluß tropfenweise, mit einer Jodlösung, die in 1000 ccm 105 g Jod und 180 g Kaliumjodid enthält. Es wird solange Jodlösung zugesetzt, bis die Flüssigkeit eine rötliche Färbung angenommen hat. Die Mischung läßt man 3 Stunden stehen, gibt sodann noch einige Tropfen Jodlösung hinzu, bis die Flüssigkeit ihre ursprüngliche gelbe Farbe wieder annimmt und stellt sie etwa 18 Stunden an einen kühlen Platz. Bei Flüssigkeiten, die nur 0,1—0,3% Äthylalkohol enthalten, ist es erforderlich, die Krystallisation des Jodoforms durch Reiben an der Glaswand einzuleiten. Nach weiteren 24 Stunden filtriert man das Jodoform ab, wäscht mit möglichst kaltem Wasser bis zur Jodfreiheit des Filtrats und trocknet zwischen Filtrierpapier ab. Das Jodoform erhitzt man mit 30 ccm kalt gesättigter alkoholischer Kalilauge 20 Minuten lang unter Rückfluß, säuert mit etwa 5 ccm Salpetersäure an, versetzt mit 20 ccm 0,01 N.-Silbernitratlösung und titriert den Überschuß mit 0,01 N.-Rhodanlösung zurück. Die in 100 ccm Flüssigkeit enthaltene Alkoholmenge  $x$  läßt sich aus  $x = \frac{y-1,25}{7,50}$  errechnen;  $y$  ist die verbrauchte Anzahl ccm 0,01 N.-Silbernitratlösung.

### d) Oxydationsverfahren.

Äthylalkohol wird durch Kaliumpermanganat und Chromsäure (Kaliumbichromat-Schwefelsäure) in saurer Lösung je nach den Versuchsbedingungen mehr oder weniger vollständig zu Essigsäure oxydiert.

<sup>1</sup> Die entsprechenden Raumprocente und Gramme in 100 ccm können aus der Tabelle von K. WINDISCH (Tabelle VIII A im Anhang) entnommen werden.

<sup>2</sup> A. BECKEL: Z. 1929, 58, 78.

<sup>3</sup> K. SENNEWALD: Z. 1930, 60, 409.

<sup>4</sup> B. WAGNER: Tabellen zum Eintauchrefraktometer. 2. Aufl. Sondershausen 1928; Selbstverlag des Verfassers. (Neudruck der Äthylalkoholtabelle von A. BECKEL 1932.)

<sup>5</sup> VILLEDIEU u. HÉBERT: Journ. Pharm. et Chim. 1917, [7] 15, 41; C. 1917, I, 694.

Soweit die Bestimmungen des Alkohols hierbei auf der Titration der verbrauchten Oxydationsmittel beruhen (B. RÖSE<sup>1</sup>, NICLOUX<sup>2</sup>, R. O. HERZOG<sup>3</sup>, H. P. BARENDRECHT<sup>4</sup>, R. M. CHAPIN<sup>5</sup>, ASTRUC und RADET<sup>6</sup> u. a.) sind sie ungenau und nicht spezifisch. Brauchbarer sind die Verfahren, die auf der Bestimmung der Essigsäure durch Destillation und Titration des Destillates beruhen.

Zu diesen Verfahren gehören:

α) Verfahren von A. W. DOX und A. R. LAMB<sup>7</sup>. Die alkoholische Lösung wird mit Ammoniumsulfat gesättigt und der vorhandene Alkohol mittels eines Luftstromes bei Zimmertemperatur in konz. Schwefelsäure getrieben. Das Alkohol-Schwefelsäuregemisch wird sodann mit Kaliumbichromat oxydiert, die gebildete Essigsäure wird überdestilliert und titrimetrisch bestimmt. Die Genauigkeit des Verfahrens beträgt 1,5%.

Aceton, sowie gewisse Ester können die Reaktion beeinflussen. Methylalkohol gibt nur sehr wenig Ameisensäure bei der Oxydation.

β) Verfahren von E. MARTIN<sup>8</sup>. Er empfiehlt die Oxydation des Alkohols mit Bichromatlösung und Schwefelsäure (1:2) bei 50°, unter welchen Bedingungen die Oxydation quantitativ bis zur Essigsäure verläuft.

γ) Siehe ferner die Verfahren von von ST. KETTLE (S. 1004) und J. HETPER (S. 1004).

#### e) Aussalzverfahren mit Kaliumcarbonat.

Das von N. C. NAG und P. LAL<sup>9</sup> angegebene Verfahren eignet sich namentlich zur Bestimmung des Äthylalkohols in konzentrierten Alkohollösungen (über 20%), ist schnell ausführbar und hinreichend genau, aber nicht für Äthylalkohol spezifisch. Die Differenz gegenüber dem pyknometrischen Verfahren beträgt nach K. TÄUFEL und H. DÜNWARD<sup>10</sup> weniger als 1% des Alkohols. Man verfährt, wie folgt:

Zu der in einem in 0,1 ccm eingeteilten Zylinder<sup>11</sup> befindlichen gewogenen Untersuchungsflüssigkeit — etwa 10 ccm — gibt man einen Überschuß von wasserfreiem Kaliumcarbonat, fügt, falls der Alkoholgehalt über 90% beträgt, 5—10% Wasser hinzu und schüttelt die Mischung bis zur Sättigung der wäßrigen Schicht mit Kaliumcarbonat. Dann läßt man bis zur Trennung der Schichten stehen oder zentrifugiert. Von den entstandenen 3 Schichten besteht die untere aus festem Kaliumcarbonat, die mittlere aus gesättigter Kaliumcarbonatlösung und die obere aus „Alkoholhydrat“ ( $4 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ ), entsprechend 94,06 Vol.-% oder 91,09 Gew.-% Alkohol. Die wäßrige Kaliumcarbonatlösung enthält je ccm 0,00275 ccm Alkoholhydrat. Der Alkoholgehalt (Gew.-%) läßt

<sup>1</sup> B. RÖSE: Zeitschr. angew. Chem. 1888, 31. — Vgl. dazu BENEDIKT: Chem.-Ztg. 1888, 12, Rep. 53 u. L. GRÜNHUT: Chem.-Ztg. 1891, 15, 847.

<sup>2</sup> NICLOUX: Ann. Chim. analyt. 1896, 1, 445. — Vgl. dazu E. POZZI-ESCOT: Z. 1903, 6, 280 u. 1905, 9, 29.

<sup>3</sup> R. O. HERZOG: Liebig's Ann. 351, 263; C. 1907, I, 762.

<sup>4</sup> H. P. BARENDRECHT: Zeitschr. analyt. Chem. 1913, 52, 167.

<sup>5</sup> R. M. CHAPIN: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1921, 13, 543; C. 1921, IV, 686.

<sup>6</sup> ASTRUC u. RADET: Ann. Falsif. 1925, 18, 165; C. 1925, I, 2743.

<sup>7</sup> A. W. DOX u. A. R. LAMB: Journ. Amer. Chem. Soc. 1916, 38, 2561; C. 1917, I, 695.

<sup>8</sup> E. MARTIN: Chim. et Ind. 1926, 16, 638; C. 1927, I, 2248.

<sup>9</sup> N. C. NAG u. P. LAL: Journ. Soc. Chem. Ind. 1918, 37, T 290; C. 1919, IV, 288.

<sup>10</sup> K. TÄUFEL u. H. DÜNWARD: Z. 1929, 58, 485.

<sup>11</sup> K. TÄUFEL u. U. PANKOW (Apoth.-Ztg. 1928, 43, 240) haben einen für die Bestimmung besonders geeigneten 25-cm-Zylinder mit kugelförmiger Erweiterung angegeben. Für Wein und Bier empfehlen K. TÄUFEL u. H. DÜNWARD (Z. 1929, 58, 485) Zylinder mit 50 bzw. 100 ccm Fassungsraum, die auch zum Auffangen der Destillate dienen.

sich alsdann nach der Formel berechnen:

$$\frac{(V + v \cdot 0,00275) [1 - 0,001068 (t - 15,6)] \cdot 0,7936 \cdot 94,06}{G},$$

oder für 20°:

$$\frac{(V + v \cdot 0,00275) \cdot 74,28}{G},$$

worin bedeutet:

- $V$  = abgeschiedenes Volumen des Alkoholhydrates in Kubikzentimeter,  
 $v$  = Volumen der gesättigten Kaliumcarbonatlösung,  
 $t$  = die Versuchstemperatur in Graden C,  
 $G$  = Gewicht der angewandten Menge Flüssigkeit in Gramm,  
 0,00275 = Löslichkeit des Alkoholhydrats in der Kaliumcarbonatlösung,  
 0,001068 = Ausdehnungskoeffizient des Alkoholhydrats,  
 0,7936 = Spezifisches Gewicht des absoluten Alkohols bei 15,6°/15,6°,  
 94,06 = Vol.-% Alkohol in der Alkoholhydratschicht.

Beträgt die Schicht der wäßrigen Kaliumcarbonatlösung weniger als 2 ccm, so braucht die Löslichkeit des Hydrates darin bei der Berechnung nicht mehr berücksichtigt zu werden. Feste Körper in Lösung beeinträchtigen die Bestimmung nicht. Das Verfahren wurde von J. GADAMER und E. NEUHOFF<sup>1</sup> zur Bestimmung der sog. Alkoholzahl des Deutschen Arzneibuches herangezogen.

Die Methode ist auch auf Methylalkohol anwendbar.

### f) Sonstige Verfahren.

Die nachfolgenden Verfahren werden in chemischen Laboratorien kaum noch angewendet, mögen aber hier doch kurz Erwähnung finden, weil sie auf besonderen Eigenschaften des Äthylalkohols beruhen. Sie besitzen nur eine verhältnismäßig geringe Genauigkeit und sind nicht spezifisch für Äthylalkohol.

α) Vaporimetrisches Verfahren von GEISSLER. Es benutzt die verschiedene Dampfspannung von Wasser und Alkohol zur Bestimmung. Die Spannkraft des Wasserdampfes bei 100° beträgt 760 mm, die des Alkoholdampfes bei derselben Temperatur nach REGNAULT 1692,9, nach PFLÜCKER 1691,2 mm; Mischungen von Alkohol und Wasser besitzen bei 100° eine Dampfspannung, welche zwischen der des Wasser- und des Alkoholdampfes liegt. Der Apparat gleicht einer Barometerröhre, an welcher der Schenkel mit der Barometerröhre zugeschmolzen und der längere Schenkel offen ist. Von einer näheren Beschreibung des Vaporimeters und dessen Handhabung kann hier abgesehen werden, da sie den Apparaten beigegeben zu werden pflegen. Da die Skalen der im Handel vorkommenden Vaporimeter nicht selten verschieden sind, so soll man jeden Apparat vor dem Gebrauch einer Prüfung unterziehen und empfiehlt C. WEIGELT, tunlichst 2 Apparate nebeneinander zu gebrauchen. Die Ansichten über die Brauchbarkeit des Vaporimeters sind geteilt. M. TRAUBE hat an dem GEISSLERSchen Vaporimeter einige Verbesserungen angebracht<sup>2</sup>. Sonstige Vaporimeter geben WOLLNY<sup>3</sup> und CH. TH. GERLACH<sup>4</sup> an.

β) Dilatometrisches Verfahren von SILBERMANN. Es geht von der verschiedenen Ausdehnung der alkoholischen Flüssigkeiten durch die Wärme aus. Setzt man das Volumen bei 0° = 1, so ist das des Wassers nach KOPF bei 25° = 1,002705, bei 50° = 1,011766, das des Alkohols bei 25° = 1,02680, bei 50° = 1,05623; innerhalb dieser Temperaturen verhält sich die Ausdehnung des Wassers zu der des Alkohols wie 0,009061:0,02943 oder wie 1:3,25; in Alkoholmischungen nimmt die Ausdehnung mit steigendem Alkoholgehalt zu. Die Ausdehnungsmessung wird in Gefäßen mit aufgesetzten, engen kalibrierten Röhren vorgenommen.

γ) Ebullioskope. Die Apparate gründen sich auf die verschiedenen Siedepunkte von Wasser und Alkohol. Reines Wasser siedet bei 100°, reiner Alkohol bei 78,3°; Mischungen von Wasser und Alkohol haben Siedepunkte zwischen beiden Grenzen, in der Weise, daß, je höher der Alkoholgehalt ist, desto mehr sich der Siedepunkt der letzteren Grenze nähert und umgekehrt. Das Ebullioskop von MALLIGAND ist ein Thermometer mit verhältnismäßig großer Kugel und einer sehr englumigen Röhre, welche in der Mitte rechtwinklig gebogen ist; der Stand des Quecksilbers für Wasserdampf von 100° ist hier mit 10, der für

<sup>1</sup> J. GADAMER u. E. NEUHOFF: Apoth.-Ztg. 1925, 40, 936.

<sup>2</sup> Zu beziehen von C. Gerhardt, Bonn.

<sup>3</sup> WOLLNY: Zeitschr. analyt. Chem. 1885, 24, 206.

<sup>4</sup> CH. TH. GERLACH: Zeitschr. analyt. Chem. 1885, 24, 577.

reinen Alkoholdampf von  $78,3^{\circ} = 100$  gesetzt. Die Zwischenskaltenteile geben direkt die Alkoholprozentage in Mischungen von Alkohol und Wasser an.

δ) Liquometer von MUSCULUS. Es hat die verschiedene Steighöhe von Wasser und Alkohol in Capillarröhren zum Grundsatz der Alkoholbestimmung. Nach GAY-LUSSAC beträgt in einer Capillarröhre von 1,294 mm Durchmesser die Steighöhe für Wasser 23,379 mm, für Alkohol vom Spez. Gewicht  $0,8196 = 9,398$  mm; Mischungen von Wasser und Alkohol zeigen dem Gehalt an letzterem entsprechende Unterschiede in der Steighöhe.

e) Tropfenzähler von SALLERON und DUCLAUX. Eine alkohohaltige Flüssigkeit besitzt eine geringere Oberflächenspannung als Wasser, und zwar eine um so geringere, je höher dieser Alkoholgehalt ist. Man kann diese Spannung dadurch messen, daß man aus einer Pipette mit enger Ausflußröhre und von bekanntem Volumen die alkohohaltige Flüssigkeit abtropfen läßt, die Anzahl der erhaltenen Tropfen zählt und aus dieser den Alkoholgehalt ermißt. Das Ausflußröhrchen ist so justiert, daß ein Tropfen Wasser von  $15^{\circ}$  genau 50 mg, folglich 20 Tropfen = 1 g wiegen. Das Gewicht von 20 Tropfen Alkohol ist um so geringer, je höher der Alkoholgehalt ist.

Das Stalagmometer von I. TRAUBE<sup>1</sup> ist eine Abänderung des SALLERONSchen Tropfenzählers; man zählt die aus einem bestimmten Volumen der alkoholischen Flüssigkeiten auslaufenden Tropfen und ermißt aus der Anzahl der letzteren den Gehalt an Alkohol, nachdem man die Tropfenzahl für Alkohollösungen von verschiedenem Gehalt bei verschiedenen Temperaturen festgestellt hat. I. TRAUBE hat für Alkohollösungen bis zu 10 Gew.-% Alkohol und für Temperaturen von  $10-30^{\circ}$  eine Tabelle entworfen.

Über die Bestimmung des Äthylalkohols neben Methylalkohol siehe S. 999.

## C. Propylalkohole.

Der (n-)Propylalkohol und der Isopropylalkohol ( $C_3H_8O$ ) kommen als normale Bestandteile des Fuselöls vor. Neuerdings werden beide Alkohole technisch zu gegenüber dem hochversteuerten Äthylalkohol niedrigen Preisen hergestellt und kommen daher bei der Ähnlichkeit ihrer Eigenschaften mit denen des Äthylalkohols als Ersatz für diesen in Frage.

Beide Alkohole sind farblose, mit Wasser in jedem Verhältnis mischbare, angenehm riechende Flüssigkeiten.

Propylalkohol,  $CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$ , hat ein Spez. Gewicht von  $0,8044 \left( \frac{20^{\circ}}{4^{\circ}} \right)$  [ $0,8066$  ( $15^{\circ}$ )] und den Siedepunkt  $97,4^{\circ}$ . Bei der Oxydation liefert er Propionaldehyd und Propionsäure.

Isopropylalkohol,  $CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_3$ , hat ein Spez. Gewicht von  $0,7903 \left( \frac{15^{\circ}}{15^{\circ}} \right)$  und den Siedepunkt  $80,7-81,4^{\circ}$ . Bei der Oxydation liefert er Aceton, Essigsäure und Ameisensäure.

Über die Schmelzpunkte der zur Unterscheidung beider Alkohole geeigneten Ester s. die Tabelle auf S. 978.

Zum weiteren Nachweis und zur Bestimmung beider Alkohole, auch bei Gegenwart von Äthylalkohol, sind folgende Verfahren vorgeschlagen:

### 1. Bestimmung des Propylalkohols.

O. NOETZEL<sup>2</sup> hat ein Verfahren zur annähernden Bestimmung des Propylalkohols neben Äthylalkohol angegeben, das auf der Oxydation zu Propionaldehyd beruht, dessen Menge colorimetrisch mit Vanillin bestimmt wird.

Der zu untersuchende Alkohol oder sein Destillat ist annähernd auf 40 Vol.-%, d. h. auf das Spez. Gewicht von 0,95, zu bringen. Man stellt sich außerdem verschiedene Vergleichslösungen von reinen Propyl-Äthylalkoholgemischen mit einem Gesamt-Alkoholgehalt von etwa 40 Vol.-% her, die z. B. 5, 10, 15 und 20 %

<sup>1</sup> I. TRAUBE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1887, 20, 2644, 2824, 2829, 2831.

<sup>2</sup> O. NOETZEL: Z. 1932, 64, 292.

Propylalkohol enthalten. In 200 ccm fassenden Rundkolben werden je 5 ccm des Untersuchungs- und der Vergleichsalkohole, 6 ccm 25%ige Chromsäurelösung, 0,5 ccm 50%ige Schwefelsäure und eine Messerspitze Bimsstein gegeben. Der Kolben wird mittels eines zweimal umgebogenen etwa 10 mm weiten Glasrohres<sup>1</sup> mit einem senkrecht stehenden Kühler verbunden. Das Ende des Kühlers wird mittels Gummischlauches mit einem Glasröhrchen verbunden, das zu einer Spitze ausgezogen ist und bis auf den Boden eines entsprechend bezeichneten Reagensglases reicht, das bei 4 ccm Inhalt eine Marke trägt. Das Reagensglas wird vor Beginn der Destillation bis fast an den Rand in Eiswasser gestellt.

Nachdem mit kleiner Flamme der Kolbeninhalt zum Sieden erhitzt ist, reguliert man die Destillation in der Weise, daß zur Gewinnung von 4 ccm Destillat 5 Minuten erforderlich sind. Gegen Ende der Destillation ist das Reagensglas tiefer zu senken, um das Destillat abtropfen zu lassen. Man verschließt das Reagensglas mit einem Stopfen und stellt es beiseite. Nachdem sämtliche Versuchsproben in genau derselben Weise behandelt sind, pipetiert man von jeder Destillationsprobe je 0,6 ccm in je ein gleich weites, entsprechend bezeichnetes Reagensglas, fügt genau 3 Tropfen alkoholischer 2%iger Vanillinlösung (Tropfflasche) und 4 ccm rauchende Salzsäure hinzu. Nach Umschütteln stellt man die Gläser in ein Becherglas mit so viel Wasser von 65°, daß das Niveau der Flüssigkeiten außen und innen gleich ist, und läßt 6 Minuten bei dieser Temperatur stehen. Dann kühlt man sofort durch Einstellen in kaltes Wasser ab, verdünnt bei starker Färbung mit je 4 bzw. 8 ccm 25%iger Salzsäure und vergleicht die Färbung des unbekanntes Gemisches mit der der Vergleichsgläser. Man erhält nach diesem Verfahren folgende Färbungen:

| Propylalkohol (%) | Färbung:                           | Die Farbtöne lassen sich     |
|-------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 3                 | orange (besonders in der Aufsicht) | annähernd mit der einer kol- |
| 5                 | deutlich rosa                      | loidalen Ferrocyanokupfer-   |
| 10                | rotbräunlich                       | lösung vergleichen. Zur ge-  |
| 15                | purpurrot bis bräunlich            | naueren Feststellung werden  |
| 20                | tiefpurpurrot.                     | noch weitere Verdünnungen    |

oxydiert. Die Grenze der Unterscheidungsmöglichkeit liegt bei etwa 3% Propylalkohol zwischen 2 Proben.

Geringe Mengen von Isopropylalkohol beeinflussen den Farbton nur wenig. Bei Anwesenheit größerer Mengen empfiehlt es sich, das bei der Oxydation gebildete Aceton durch Zusatz von etwa 0,2 g Hydroxylaminchlorhydrat und halbstündiges Stehenlassen vor Anstellung des colorimetrischen Versuches zu beseitigen.

Das beschriebene Verfahren eignet sich auch zur Bestimmung des normalen Butylalkohols, der ähnliche Farbtöne gibt. Zu seiner Unterscheidung von Propylalkohol sind vor allem die physikalischen Konstanten heranzuziehen.

## 2. Nachweis des Isopropylalkohols.

Die Abwesenheit von Isopropylalkohol kann man mittels folgender einfachen Reaktion feststellen: Erhitzt man die alkoholische Flüssigkeit mit dem doppelten Volumen konz. Schwefelsäure und färbt sich hierbei die Mischung nicht braun oder schwarz, so ist in der Flüssigkeit kein Isopropylalkohol vorhanden.

### a) Nachweis durch Oxydation zu Aceton.

Der Nachweis des Isopropylalkohols wird am zuverlässigsten durch die Überführung in Aceton erbracht.

<sup>1</sup> Entsprechend der Form und dem Ausmaß eines REICHERT-MEISSL-Aufsatzes, aber ohne Kugel.



a) **Verfahren von O. NOETZEL**<sup>1</sup>. 2—3 ccm des zu untersuchenden Alkohols werden mit 9 ccm Wasser verdünnt und in ein 50 ccm-Kölbchen gebracht. Dann wird 1 g Chromsäure hinzugefügt und unter guter Kühlung werden 2—3 ccm in ein Reagensglas überdestilliert. Zum Destillat gibt man 1 ccm 10%iges Ammoniak und läßt 3 Stunden gut verkorkt stehen. Dann fügt man 1 ccm 10%ige Natronlauge und 1 ccm einer frisch bereiteten 2,5%igen Lösung von Nitroprussidnatrium hinzu. Bei Gegenwart von Aceton tritt eine rote Färbung auf, die nach vorsichtigem Ansäuern mit Essigsäure unter guter Kühlung in Rotviolett übergeht. Aldehyd gibt bei dieser Anordnung gelbliche, nach dem Ansäuern grünliche Farbtöne. Da alkoholische Flüssigkeiten bisweilen Spuren von Aceton enthalten, empfiehlt es sich, die Prüfung auf Aceton auch vor der Oxydation anzustellen.

Auch J. RAE<sup>2</sup> und D. HENVILLE<sup>3</sup> oxydieren den Isopropylalkohol mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure und prüfen das Destillat mit Nitroprussidnatrium unter Zusatz von Ammoniak auf Aceton.

β) **Nachweis mit DENIGÈS' Reagens**. Die Reaktion verläuft folgendermaßen: Oxydation des Isopropylalkohols zu Aceton, zugleich Reduktion des Mercurisulfats zu Mercurosulfat, welches ausfällt, dann Bildung von Mercurisulfat-Aceton, das ebenfalls ausfällt. Infolge wechselnden Gehalts des Isopropylalkohols an Aceton wechselt auch die Zusammensetzung des Niederschlages. Die Analyse eines mit acetonfreiem Isopropylalkohol und DENIGÈS' Reagens in der Siedehitze dargestellten Niederschlages ergab, daß er aus einem Gemisch von Mercurosulfat und einer Mercurisulfat-Acetonverbindung besteht.

Nach C. STAINIER und A. LAUWAET<sup>4</sup> gibt Isopropylalkohol, auch in Spuren, nach dem Erhitzen mit DENIGÈS' Reagens auf Aceton auch bei Gegenwart anderer Alkohole einen gelben Niederschlag, während angeblich durch Aceton und Formaldehyd ein weißer Niederschlag entsteht. H. MATTHES und P. SCHÜTZ<sup>5</sup> können die Angaben von C. STAINIER und A. LAUWAET nicht bestätigen. Reiner Isopropylalkohol gibt mit DENIGÈS' Reagens einen weißen Niederschlag; gelbe Niederschläge sind durch ungesättigte Verbindungen bedingt. Die Reaktion ist nicht spezifisch für Isopropylalkohol, sondern für Aceton.

γ) **Nachweis mit Nitrophenylhydrazin nach F. WEISS**<sup>6</sup>. 0,1 ccm der Isopropylalkohollösung wird in ein etwa 20 ccm fassendes Rundstehkölbchen, das vorher mit 5 ccm Wasser und 8—10 Tropfen einer 50%igen Chromsäurelösung beschickt worden war, gebracht. Hierauf verbindet man das Kölbchen sofort mit der Destillationsvorrichtung und destilliert langsam etwa 3 ccm in einen REICHERT-MEISSEL-Kolben ab, der 2,5 g einer 50%igen Silbernitratlösung und 1 g einer 30%igen Natronlauge auf 10 ccm Wasser enthält. Dieses Gemisch kocht man alsdann 4 Stunden lang an einem LIEBIGSchen Kühler, dessen Kühlfläche ungefähr 35 cm lang ist. Nach dem Erkalten und 2—3stündigem Stehenlassen wird von der Flüssigkeit etwa 1 ccm abdestilliert. Dieses Destillat dient zum Nachweis des Acetons nach der GRIEBELSchen Mikrobechermethode.

Zu dem Zweck bringt man die Menge von 1 ccm in einen kleinen, oben glatt abgeschnittenen und etwas plangeschliffenen Becher aus Jenaer Glas von etwa 25 mm Höhe und etwa 10 mm lichter Weite. Hierauf wird das Becherrchen sofort mit einem Deckgläschen bedeckt, das nach leichtem Einfetten kurz vorher auf der nach unten zu kehrenden Seite mit Hilfe eines dünnen Glasstäbchens mit einem Reagenströpfchen versehen war. Das Tröpfchen soll annähernd 2 mm

<sup>1</sup> O. NOETZEL: Z. 1927, 53, 388. — Vgl. auch H. GUINOT: Z. 1931, 62, 330.

<sup>2</sup> J. RAE: Pharm. Journ. 1926; Pharm. Zentralh. 1928, 69, 590.

<sup>3</sup> D. HENVILLE: Analyst 1928, 53, 416.

<sup>4</sup> C. STAINIER u. A. LAUWAET: Journ. Pharmac. Belg. 1928, 10, 167; C. 1928, I, 1897.

<sup>5</sup> H. MATTHES u. P. SCHÜTZ: Pharm. Ztg. 74, 44; C. 1929, I, 1245.

<sup>6</sup> F. WEISS: Z. 1929, 57, 45.

Durchmesser haben und möglichst in der Mitte der Öffnung des Becherehens und mindestens 3 mm über dem Untersuchungsmaterial hängen. Die Reagenlösung wird bereitet, indem man eine kleine Menge m-Nitrophenylhydrazin mit etwa 0,5 ccm 15%iger Essigsäure in einer Reibschale verreibt und von dem Ungelösten klar abfiltriert. Sodann erwärmt man das Becherehen auf einem schwach geheizten und mit Tonplatten bedeckten Wasserbade, bis sich zahlreiche kleine Wassertröpfchen an dem Deckgläschen niedergeschlagen haben. Schließlich stellt man das Becherehen 10—15 Minuten zum Erkalten beiseite und durchmustert dann den Reagenstropfen unter dem Mikroskop. Ist kein Isopropylalkohol vorhanden, so bilden sich in dem Reagenstropfen keine Krystalle. Bei Gegenwart von Spuren Acetaldehyd bilden sich in dem Reagenstropfen vereinzelte kanariengelbe, gedrungene, schild- oder tafelförmige Gebilde, seltener kleine gedrungene Nadeln von Acetaldehyd-m-Nitrophenylhydrazon. Bei Gegenwart von etwa 1% Isopropylalkohol bildet sich eine größere Anzahl goldgelber, stark spitz auslaufender, meist leicht gebogener Krystallnadeln von Aceton-m-Nitrophenylhydrazon.

### b) Nachweis mittels Piperonals nach G. REIF<sup>1</sup>.

Von 10 ccm der zu untersuchenden Probe wird der Alkohol auf dem siedenden Wasserbad in einen kleinen Meßzylinder, der in Eiswasser steht, abdestilliert. 0,3 ccm des Destillates werden mit 0,7 ccm eines etwa 80%igen Äthylalkohols in ein Reagensglas gebracht, in dem sich eine zuvor bei gewöhnlicher Temperatur bereitete Lösung von 0,1 g Hydroxylaminhydrochlorid in 3 ccm Wasser befindet. Hierauf wird gut durchgeschüttelt und genau 3 Minuten bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Dann werden 0,4 g Kohle (Carbo medicinalis D.A.B. 6) hinzugefügt, abermals gut durchgeschüttelt und durch ein trockenes Filter in einen 100 ccm-Kolben filtriert. Zu diesem Filtrat werden 5 ccm einer alkoholischen 0,5%igen Piperonallösung (0,5 g in 100 ccm absolutem Alkohol), dann langsam unter Vermeidung des Siedens 20 ccm konz. Schwefelsäure (1,84) hinzugegeben und hierauf wird gut durchgeschüttelt. 4—5 ccm dieses Reaktionsgemisches werden in ein etwa 50 ccm fassendes Bechergläschen von etwa 4 cm Durchmesser gebracht und genau 5 Minuten auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Darauf werden 30 ccm einer 30%igen reinen Essigsäure hinzugegeben. Bei Anwesenheit von Isopropylalkohol nimmt die Lösung eine rosa bis rote Färbung an, die  $\frac{1}{2}$  Stunde und länger bestehen bleibt. Als maßgebend für die Anwesenheit von Isopropylalkohol wird die etwa 10—15 Minuten nach Zugabe der 30%igen Essigsäure vorliegende Färbung angesehen. Bei Abwesenheit von Isopropylalkohol wird die essigsäure Lösung entweder sofort farblos oder schwach rosa. Die Rosafärbung verschwindet aber nach einigen Minuten wieder.

Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei etwa 1—2% Isopropylalkohol. Butylalkohol und Isobutylalkohol geben die Reaktion mit Piperonal ebenfalls.

### c) Nachweis nach K. BODENDORF<sup>2</sup>.

Aus 5 ccm der Untersuchungsflüssigkeit werden nach Zusatz von 5 ccm Wasser 5 ccm über freier Flamme abdestilliert. 1—2 ccm Destillat werden mit 2—4 ccm Wasser verdünnt und zur Entfernung etwa vorhandener ätherischer Öle mit 0,2 g Kohle (Carbo medicinalis D.A.B. 6) etwa 1 Minute geschüttelt. Man filtriert durch ein trockenes Filter 1—2 ccm ab und unterschichtet diese

<sup>1</sup> G. REIF: Z. 1928, 55, 204; 1929, 57, 277; 1930, 60, 243.

<sup>2</sup> K. BODENDORF: Z. 1930, 59, 616.

mit einigen ccm einer frisch bereiteten Lösung von m-Nitrobenzaldehyd in konz. Schwefelsäure (1 g Aldehyd in etwa 50 ccm Schwefelsäure). Darauf stellt man das Reagensglas für 1 Minute in heißes Wasser und beobachtet dann gegen zerstreutes Licht. Bei Gegenwart von Isopropylalkohol erhält man an der Berührungsstelle einen intensiv leuchtenden roten Ring, der bald die ganze Schwefelsäureschicht durchdringt. Der Nachweis ist so empfindlich, daß man Isopropylalkohol noch in einer Konzentration von 0,1% mit Sicherheit erkennen kann. Falls nicht ein roter, sondern ein gelber Ring entstehen sollte, der von nicht entfernten ätherischen Ölen herrühren kann, wiederholt man nach dem Verdünnen mit dem doppelten Volumen Wasser die Schüttelung mit Kohle.

#### d) Nachweis nach H. LEFFMANN und C. PINES<sup>1</sup>.

Zu 1 ccm der zu untersuchenden Lösung gibt man 1 ccm einer gesättigten Lösung von Dinatriumphosphat und 3 ccm einer gesättigten Lösung von Kaliumpermanganat, erwärmt gelinde und läßt bis zur vollständigen Entfärbung stehen. Darauf versetzt man mit 3 ccm 10%iger Natronlauge und 1 ccm 1%iger Furfurolösung und filtriert. Etwa 1 ccm Filtrat wird in mehrere ccm konz. Salzsäure gegeben und das Gemisch darauf leicht erwärmt. Eine lachs- bis kirschrote Färbung zeigt die Gegenwart von Isopropylalkohol an.

### 3. Bestimmung des Isopropylalkohols.

#### a) Verfahren von O. NOETZEL<sup>2</sup>.

Der zu untersuchende Alkohol — besser sein Destillat — ist soweit zu verdünnen, daß 100 ccm nicht mehr als 5 ccm Alkohol enthalten. 25 ccm der Lösung werden in einen 500 ccm-Rundkolben pipettiert, in den man vorher bereits 50 ccm Kaliumbichromatlösung (96 g/l) gebracht hat; darauf setzt man 100 ccm Schwefelsäure (500 g/l) zu, verschließt den Kolben und kühlt sofort im Wasserbade ab. Nach 3—4stündigem Stehen bei Zimmertemperatur werden zur Reduktion der unveränderten Chromsäure 100 ccm Ferrosulfatlösung (250 g/l) zugegeben. Unter Vorlage von 5 ccm 10%iger Natronlauge und 15 ccm Wasser in einem 200 ccm-Rundkolben werden etwa 75 ccm mit Wasserdampf unter Verwendung eines Kugelaufsatzes abdestilliert. Die Vorlage ist möglichst kalt zu halten. Der Kühler taucht mittels eines Ansatzes in die Flüssigkeit der Vorlage. Von dem Destillat werden sofort nach Zusatz von etwas Bimsstein etwa 50 ccm in eine Vorlage destilliert, die 2 g Hydroxylaminhydrochlorid in 20 ccm Wasser enthält. Das Destillat wird verkorkt unter öfterem Umschütteln 1 Stunde stehen gelassen.

Zur Bestimmung des Säuregrades des in der Regel etwas sauren Hydroxylaminhydrochlorids löst man 2 g des Salzes in ebenso viel Wasser wie das Volumen des Destillates beträgt, setzt 2 Tropfen Methylorange (0,1 g/100 ccm) hinzu und titriert mit 0,25 N.-Natronlauge bis auf Gelborange. Hierzu genügen meist 0,5—0,6 ccm der Lauge. Diese neutralisierte Lösung dient zum colorimetrischen Vergleich bei der Titration des Destillates, da der Farbenschlag hier nicht so scharf ist, wie bei reinen acidimetrischen Bestimmungen. Der Titer der Natronlauge ist gleichfalls auf diesen Farbton einzustellen.

Nachdem das Destillat die vorgeschriebene Zeit gestanden hat, werden 2 Tropfen Methylorange zugesetzt, und darauf wird mit 0,25 N.-Natronlauge

<sup>1</sup> H. LEFFMANN u. C. PINES: Amer. Journ. Pharmac. 1930, 102, 39; C. 1930, I, 3218. — Das Verfahren lehnt sich an die Arbeiten von L. E. DAHLE und P. W. SIMONDS an.

<sup>2</sup> O. NOETZEL: Z. 1927, 53, 388.

auf den Farbenton der Kontrollösung titriert. Von den verbrauchten ccm Lauge sind die zur Neutralisation von 2 g Hydroxylaminhydrochlorid verbrauchten ccm abzuziehen. Man erhält die Menge des Isopropylalkohols, ausgedrückt in Vol.-%, wenn man unter Berücksichtigung der Verdünnung die verbrauchten ccm 0,25 N.-Natronlauge mit 0,015 multipliziert und durch das Spez. Gewicht des Isopropylalkohols (0,789 bei 20°) dividiert.

## 2. Verfahren von H. A. CASSAR<sup>1</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Oxydation des Isopropylalkohols in schwefelsaurer Lösung mit überschüssiger N.-Bichromatlösung unter Schütteln innerhalb 10 Minuten. In einem aliquoten Teil der Lösung wird der Überschuß an Bichromat mit Kaliumjodid und Thiosulfatlösung in Gegenwart von aktivierter Stärke (mit sehr verd. Salzsäure behandelte und längere Zeit bei 100° getrocknete Stärke) zurückgemessen. Die Fehler halten sich in den Grenzen —0,5 bis +0,5%. Die Gegenwart von 40% Aceton beeinflusst das Resultat nicht. 1 ccm N.-Bichromatlösung = 0,03003 g Isopropylalkohol. Sek. Butylalkohol,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_3$ , kann in gleicher Weise bestimmt werden. 1 ccm N.-Bichromatlösung = 0,3705 g sek. Butylalkohol.

## D. Butylalkohole.

Von den 4 isomeren Butylalkoholen ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) kommen (n-)Butylalkohol und Isobutylalkohol als normale Bestandteile des Fuselöles vor.

(n-)Butylalkohol entsteht auch bei der Vergärung von Glycerin durch den *Bacillus butylicus*, der auch eine Gewinnung des Alkohols aus Mais und Melasse ermöglicht.

Butylalkohol,  $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$ , hat ein Spez. Gewicht von 0,8098 ( $\frac{20^\circ}{4^\circ}$ ) und den Siedepunkt 117,0—117,5°. Er löst sich in 11—12 Tln. Wasser und läßt sich aus der wäßrigen Lösung durch Calciumchlorid aussalzen. Bei der Oxydation entstehen Butyraldehyd und n-Buttersäure.

Isobutylalkohol,  $(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$ , hat ein Spez. Gewicht von 0,8003 (18°) und den Siedepunkt 108,1°; mit Wasser bildet er ein bei 90,5° konstant siedendes Gemisch. Er löst sich in 10,5 Tln. Wasser (18°). Bei der Oxydation entstehen neben Isobuttersäure auch Essigsäure und Aceton.

Über die Schmelzpunkte der zur Unterscheidung beider Alkohole geeigneten Ester siehe die Tabelle auf S. 978, über die Farbenreaktionen S. 981.

Butylalkohol und Isobutylalkohol geben die Farbenreaktion mit Piperonal nach G. REIF ebenso wie Isopropylalkohol (S. 1017).

Zum weiteren Nachweis und zur Bestimmung beider Alkohole, auch bei Gegenwart von Äthylalkohol, sind folgende Verfahren vorgeschlagen:

### 1. Bestimmung des Butylalkohols.

a) Verfahren von A. LASSERRE<sup>2</sup>. Man versetzt 100 ccm der alkoholischen Flüssigkeit mit 60—70 ccm Schwefelkohlenstoff, darauf mit 450 ccm gesättigter Natriumchloridlösung und soviel Wasser (etwa 50 ccm), daß das ausgeschiedene Salz wieder in Lösung geht, schüttelt 5 Minuten kräftig, gießt den Schwefelkohlenstoff ab und wiederholt die kräftige Ausschüttelung mit Schwefelkohlenstoff noch zweimal. Die vereinigten Schwefelkohlenstofflösungen schüttelt man mit soviel konz. Schwefelsäure (2—3 ccm), daß letztere nach dem Schütteln zu Boden sinkt, zieht die Säure in einen 100 ccm-Kolben ab, wäscht den Schwefel-

<sup>1</sup> H. A. CASSAR: Ind. engin. Chem. 1927, 19, 1061; C. 1927, II, 2772.

<sup>2</sup> A. LASSERRE: Ann. Chim. analyt. appl. 1910, 15, 338; C. 1910, II, 1563.

kohlenstoff zweimal mit je 1 ccm Schwefelsäure nach und vereinigt die drei Schwefelsäuremengen. Man leitet jetzt über die auf 60° erwärmte Schwefelsäure einen Luftstrom, um etwa mitgerissenen Schwefelkohlenstoff zu entfernen, und setzt vorsichtig 20 ccm siedendes Wasser zu, um die höheren Alkohole frei zu machen. Nach dem Abkühlen setzt man 5 g Kaliumbichromat und 1 ccm Schwefelsäure hinzu, verschließt den Kolben sofort fest und erwärmt ihn 1 Stunde auf 50°. Nach dem Erkalten füllt man den Kolben bis zur Marke auf, schüttelt 25 ccm der Flüssigkeit 2—3 Minuten mit Benzol, hebt letzteres ab, filtriert es durch ein zuvor mit Benzol angefeuchtetes Filter, setzt dem Filtrat ein gleiches Volumen Alkohol zu und titriert mit alkoholischer 0,05 N.-Kalilauge in Gegenwart von Phenolphthalein. Bezeichnet man die bei der Titration verbrauchten ccm Kalilauge mit  $n$ , so erhält man nach der Formel:  $n \cdot 4 \cdot 2,082$  die in den 100 ccm Flüssigkeit enthaltene Menge Buttersäure, die in Butylalkohol umgerechnet wird.

Amylalkohol kann in gleicher Weise durch Überführung in Valeriansäure bestimmt werden.

b) Verfahren von C. H. WERKMAN und O. L. OSBURN<sup>1</sup>. Das Verfahren dient zur Bestimmung von Butylalkohol und Äthylalkohol in Gemischen, insbesondere zur Bestimmung beider Alkohole in Gärungsflüssigkeiten; Aceton usw. werden vor der Analyse z. B. mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin entfernt.

50 ccm alkoholisches Destillat werden mit 10 g Kaliumbichromat und 25 ccm 85%ige Phosphorsäure kurz gekocht, schnell abgekühlt und bis zur beginnenden Rauchentwicklung destilliert. Nach weiterer 3 Minuten langer Destillation sind alle organischen Säuren übergegangen; Äthylalkohol wird dabei vollständig zu Essigsäure und Butylalkohol zu einem Gemisch von 90,7% Buttersäure und 9,7% Essigsäure oxydiert. Von dem auf 100 ccm aufgefüllten Destillat werden 40 ccm (etwa 0,1 n) 1 Minute mit 20 ccm Isopropyläther bei 25° geschüttelt, worauf 25 ccm der wäßrigen Schicht mit 0,1 N.-Natronlauge titriert werden ( $P$ ); in gleicher Weise werden 25 ccm der ursprünglichen Lösung titriert ( $M$ ). Die Verteilungskonstante  $K = P/M \cdot 100$  beträgt für reine Essigsäure 89,0, für reine Buttersäure 34,8 und für das Oxydationsprodukt von Butylalkohol 40.

Ein ähnliches Verfahren hat M. J. JOHNSON<sup>2</sup> angegeben.

## 2. Nachweis des Isobutylalkohols nach A. KUTZLNIGG<sup>3</sup>.

Eine bis zur Farblosigkeit verdünnte Lösung von Blutlaugensalz — am besten 1%ige Natriumferrocyanidlösung — wird mit der zu untersuchenden Flüssigkeit im Probierröhrchen zum Sieden erhitzt. Ist Isobutylalkohol zugegen, so ist die wäßrige Schicht nach erfolgter Klärung hellbraun, in dickerer Schicht orange gefärbt. Die Probe soll neutral reagieren; längeres Kochen ist zu vermeiden. Die Reaktion ist für Isobutylalkohol charakteristisch. n-Butylalkohol und Amylalkohol geben die Reaktion nicht.

## E. Amylalkohole.

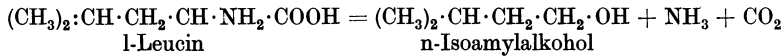
Von den acht isomeren Amylalkoholen (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O) enthält der „Gärungsamylakohol“ des Handels vorwiegend den primären (n-)Isoamylalkohol und daneben den aktiven Amylalkohol als normale Bestandteile des Fusel-

<sup>1</sup> C. H. WERKMAN u. O. L. OSBURN: Ind. engin. Chem. Analyt. Edition 1931, **3**, 387; C. 1932, II, 1045.

<sup>2</sup> M. J. JOHNSON: Ind. engin. Chem. Analyt. Edition 1932, **4**, 20; C. 1932, II, 97.

<sup>3</sup> A. KUTZLNIGG: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **77**, 319.

öles; sie entstehen bei der alkoholischen Gärung aus den Aminosäuren (l-Leucin und d-Isoleucin) der Maische:



Isoamylalkohol (Isobutylcarbinol)<sup>1</sup>,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{OH}$ , eine Flüssigkeit von durchdringendem, zum Husten reizenden Geruch und brennendem Geschmack, löslich in 40 Tln. Wasser, hat ein Spez. Gewicht von 0,8104 (20°) und den Siedepunkt 131,6°. Als Endprodukt der Oxydation mit verd. Kaliumpermanganatlösung entstehen Isovalerialaldehyd und Isovaleriansäure.

Aktiver Amylalkohol (sek. Butylcarbinol)  $\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{CH}(\text{CH}_3)\cdot\text{CH}_2\cdot\text{OH}$ , eine charakteristisch riechende, aber nicht wie Isoamylalkohol zum Husten reizende Flüssigkeit, ist optisch aktiv ( $[\alpha]_D^{20} = -5,9^\circ$ ) hat ein Spez. Gewicht von 0,8330 ( $\frac{0}{4}$ ) und den Siedepunkt 128,7°. Bei der Oxydation liefert er d-Methyläthyllessigsäure.

Anforderungen an die Reinheit des Amylalkohols (Gärungsamylalkohols) des Handels<sup>2</sup>.

1. Klare, farblose, neutrale, mit stark rußender Flamme brennende, in Wasser wenig lösliche, mit Alkohol, Äther und Benzin klar mischbare Flüssigkeit.

2. Spez. Gewicht bei 15°: 0,814; Siedepunkt 131°. Innerhalb eines Grades sollen mindestens 90 Vol.-% überdestillieren.

3. 10 g Amylalkohol, auf dem Wasserbade verdampft, dürfen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

4. Prüfung auf organische Verunreinigungen (Furfurol):

a) Werden 5 ccm Amylalkohol mit 5 ccm konz. Schwefelsäure geschüttelt, so darf sich die Mischung nur schwach gelblich oder rötlich färben.

b) Schüttelt man 5 ccm Amylalkohol mit 5 ccm Kalilauge (1,3), so darf sich der Amylalkohol nicht färben.

5. Prüfung auf Wasser: 5 ccm Amylalkohol sollen sich in 50 ccm Petroleum klar lösen.

Über die Schmelzpunkte der zur Unterscheidung beider Alkohole geeigneten Ester siehe die Tabelle auf S. 978, über die Farbenreaktionen S. 981.

Zum weiteren Nachweis und zur Bestimmung des „Amylalkohols“, auch bei Gegenwart von Äthylalkohol, sind folgende Verfahren vorgeschlagen:

### 1. Nachweis von Amylalkohol.

a) Nach H. v. WYSS, E. HERZFELD und O. REWIDZOFF<sup>3</sup>. Versetzt man 2 ccm Amylalkohol mit je 4 Tropfen  $\alpha$ -Naphthollösung (4,5 g in 100 ccm 50%igem kaltem Alkohol), p-Phenylendiaminlösung (4,5 g kalt gelöst in 100 ccm absolutem Alkohol) und Natriumcarbonatlösung (4,5 g in 100 ccm Wasser), so tritt rasch eine stark dunkelblauviolette Färbung auf, ohne daß man schüttelt. Die Reaktion ist viermal so schwach bei Isobutylalkohol und noch schwächer bei Äthyl-, Heptylalkohol und Glycerin. Mit Methyl- und Propylalkohol, Methylacetat, Essigäther und Aceton tritt die Reaktion nicht ein.

b) Nach BORNTÄGER<sup>4</sup>. Man verdünnt den zu prüfenden Alkohol mit viel Wasser; scheiden sich dann ölige Tropfen aus, so gibt man zu dem unverdünntem Alkohol 3 Tropfen konz. Salzsäure und 10 Tropfen Anilin (farblos). Bei Anwesenheit von Amylalkohol entsteht eine himbeerrote Färbung. Empfindlichkeitsgrenze = 0,05%.

c) Nach TSALAPATANI<sup>4</sup>. Man erwärmt die auf Amylalkohol zu prüfende Flüssigkeit auf dem Wasserbade mit einigen cg Chloranil (Tetrachlorchinon);

<sup>1</sup> Auch schlechthin als „Gärungsamylalkohol“ oder „Amylalkohol“ bezeichnet.

<sup>2</sup> Nach E. MERCK: Prüfung der chemischen Reagenzien auf Reinheit 1931, S. 34.

<sup>3</sup> H. v. WYSS, E. HERZFELD u. O. REWIDZOFF: Zeitschr. physiol. Chem. 1910, 64, 479.

<sup>4</sup> MERCK'S Reagenzienverzeichnis 1929, 64 u. 596.

bei Gegenwart von Amylalkohol entsteht eine orangerote Mischung und beim Erkalten scheidet sich ein ebenso gefärbter Niederschlag aus.

d) Nach MARQUARDT<sup>1</sup>. Versetzt man einige Tropfen Amylalkohol mit ein wenig Wasser und Kaliumpermanganatlösung (1:1000) bis zur bleibenden Rotfärbung und läßt im Reagensglase 24 Stunden verschlossen stehen, so riecht man beim zeitweiligem Öffnen Isovaleriansäurealdehyd, Isovaleriansäureisoamylester und zuletzt nur noch Isovaleriansäure.

e) Nach UFFELMANN<sup>1</sup>. Zu einigen Tropfen Amylalkohol wird eine frisch bereitete, durch Salzsäure grün gefärbte Lösung von Methylviolett gesetzt; beim Schütteln färben sich die Tropfen violett.

## 2. Bestimmung von Amylalkohol.

Die Bestimmung kann in gleicher Weise wie die des Butylalkohols nach A. LASSERRE (S. 1019) durch Oxydation zu Valeriansäure erfolgen.

---

<sup>1</sup> GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie, S. 302. Göttingen: Vanderhoek u. Ruprecht 1909.

# Aldehyde und Ketone.

Von

Professor **DR. A. BÖMER** und **DR. O. WINDHAUSEN**-Münster i. W.

Mit 1 Abbildung.

In diesem Abschnitt sind nur diejenigen Aldehyde und Ketone behandelt, welche entweder in mehreren Lebensmitteln als Bestandteile vorkommen oder als deren Zersetzungsprodukte oder als Reagenzien zum Nachweis und zur Bestimmung anderer Stoffe eine Rolle spielen.

Von den Aldehyden sind Formaldehyd, Acetaldehyd, Benzaldehyd, Vanillin und Piperonal, Zimt- und Salicylaldehyd, sowie Furfurol, Methylfurfurol und Oxymethylfurfurol, von den Ketonen Aceton und Diacetyl behandelt.

Über den Nachweis und die Bestimmung des Alkylaldehyds, der in Fetten vorkommenden höheren aliphatischen Ketone sowie der in ätherischen Ölen vorkommenden Aldehyde und Ketone s. Bd. IV dieses Handbuches.

Der Inhalt dieses Abschnittes ist so eingeteilt, daß der erste Hauptteil die allgemeinen Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung von Aldehyden, der zweite (S. 1035) die einzelnen Aldehyde, der dritte (S. 1058) die Ketone und der vierte (S. 1066) den Nachweis und die Bestimmung von Aldehyden, Aceton und Äthylalkohol nebeneinander behandelt.

## I. Allgemeine Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung von Aldehyden.

Die Aldehyde sind Verbindungen, welche die Gruppe  $\text{—C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \llcorner \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ , gebunden an Kohlenstoff, enthalten. Mit Ausnahme des gasförmigen Formaldehyds sind die Anfangsglieder der aliphatischen Aldehyde leichtflüssige Flüssigkeiten mit charakteristischem Geruch. Die niederen Glieder dieser Reihe sind in allen Verhältnissen mit Wasser mischbar; mit zunehmendem Kohlenstoffgehalt nimmt die Löslichkeit in Wasser ab. Alle einwertigen gesättigten Aldehyde sind farblos und löslich in Alkohol und Äther. Von cyclischen Aldehyden sind die niederen Glieder Flüssigkeiten, die in Wasser weniger löslich, aber in Alkohol und Äther ebenfalls leicht löslich sind.

### 1. Nachweis von Aldehyden.

Die Aldehyde zeigen eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften, vermöge derer sie charakterisiert und von anderen Verbindungen, auch von den Ketonen, unterschieden werden können. Die Aldehyde sind leicht oxydierbar und reduzieren infolgedessen alkalische Silber-, Kupfer- und Quecksilberlösungen; sie gehen dabei in Säuren mit der gleichen Kohlenstoffatomzahl über. Die Ketone sind schwer oxydierbar — durch schwache Oxydationsmittel werden sie überhaupt nicht angegriffen — und liefern bei starker Oxydation Säuren mit geringerer Kohlenstoffatomzahl; sie reduzieren die obigen alkalischen Metallsalzlösungen nicht.



Schmelzpunkte der Kondensationsverbindungen  
(Zusammengestellt nach L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen 1914  
Verbindungen 1933 [Berlin:

| Kondensationsverbindung  | Formaldehyd            | Acetaldehyd              | Benzaldehyd               |
|--|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Phenyl-hydrazon . . . . .  | 156,5 <sup>o</sup>     | —                        | 156 <sup>o</sup> (a)      |
| p-Brom-phenyl-hydrazon . . . . .   | —                      | 87 <sup>o</sup> (l)      | 125 <sup>o</sup> (a)      |
| p-Nitro-phenyl-hydrazon . . . . .  | 181 <sup>o</sup> (b)   | 128—129 <sup>o</sup>     | 192—193 <sup>o</sup> (a)  |
| 2,4-Dinitro-phenyl-hydrazon . . . . .                                    | 155 <sup>o</sup> (a)   | 162 <sup>o</sup> (a)     | }                         |
|  | 167 <sup>o</sup> (l)   | 167 <sup>o</sup> (l)     |                           |
| 2,4-Dinitro-m-toluy-hydrazon . . . . .                                   | 132 <sup>o</sup> (a)   | 112 <sup>o</sup> (a)     | —                         |
| Diphenyl-methan-dimethyl-dihydrazon .                                    | 137 <sup>o</sup> (a)   | 114 <sup>o</sup> (a)     | 220 <sup>o</sup>          |
| Methylen-bis-dimethyl-dihydro-resorcinn<br>(Methylen-dimethon) . . . . . | 191,4 <sup>o</sup> (a) | 139—140 <sup>o</sup> (a) | 193 <sup>o</sup>          |
| Semicarbazon . . . . .   | —                      | 163 <sup>o</sup> (a, w)  | 221—222 <sup>o</sup>      |
| Semi-oxamazon . . . . .  | —                      | —                        | 264 <sup>o</sup>          |
| $\beta$ -Naphtho-cinchoninsäure . . . . .                                | —                      | —                        | —                         |
| Hydroxamsäure . . . . .  | —                      | —                        | 131—132 <sup>o</sup> (w)  |
| Dimethyl-barbitursäure . . . . .   | —                      | —                        | 164—165 <sup>o</sup> (bu) |

Die Aldehyde liefern mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen Kondensationsprodukte (S. 1025), die bei den verschiedenen Aldehyden unter anderem durch ihre Schmelzpunkte gekennzeichnet werden; die vorstehende Tabelle enthält eine Zusammenstellung solcher Schmelzpunkte.

Zum Nachweis des aldehydisch gebundenen Carbonyls können die folgenden Reaktionen dienen.

#### a) Reduktionsreaktionen.

Infolge ihrer leichten Oxydierbarkeit üben die Aldehyde verschiedene Reduktionswirkungen aus:

$\alpha$ ) Reduktion von Silberlösung nach B. TOLLENS<sup>1</sup>. Aldehyde reduzieren ammoniakalische Silberlösung unter Spiegelbildung. Man verwendet zweckmäßig eine Lösung von 3 g Silbernitrat in 30 ccm Wasser und gesondert davon eine Lösung von 3 g Natriumhydroxyd in 30 ccm Wasser, mischt unmittelbar vor dem Gebrauch gleiche Volumen beider Lösungen und tropft langsam Ammoniak (D = 0,923) hinzu, bis das Silberoxyd eben gelöst ist. Auf Zusatz von einigen Tropfen einer Aldehydlösung entsteht ein mehr oder weniger schöner Silberspiegel, dessen Bildung durch geringes Erwärmen beschleunigt werden kann.

$\beta$ ) Reduktion von Kupferlösung<sup>2</sup>. Aliphatische — nicht aromatische — Aldehyde reduzieren in alkalischer Kupferlösung (FEHLINGScher Lösung) das Kupfer in der Kälte, schneller in der Hitze, unter Abscheidung von rotem Kupferoxydul (Cu<sub>2</sub>O).

$\gamma$ ) Reduktion von Quecksilberlösung. NESSLERS Reagens wird schon in der Kälte auch von aromatischen Aldehyden reduziert und liefert grünlich-braun oder grau gefärbte Niederschläge, die sich zum Unterschied von dem mit Ammoniak entstehenden Niederschläge nicht in Kaliumcyanid lösen<sup>3</sup>. Aceton und eine Reihe anderer Ketone liefern mit NESSLERS Reagens hellgelbe Niederschläge<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> B. TOLLENS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1881, 14, 1950; 1882, 15, 1635, 1828.

<sup>2</sup> B. TOLLENS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1881, 14, 1950.

<sup>3</sup> Nach L. CRISMER: Ann. Soc. med. chir. de Liège; Chem.-Ztg. 1886, 13, Rep. 198.

<sup>4</sup> Nach L. ROSENTHALER (Arch. Pharm. 1906, 244, 373) reduzieren auch Methyl-, Äthyl- und andere primäre und sekundäre — nicht aber tertiäre — Alkohole NESSLERS Reagens.

von Aldehyden und Aceton<sup>1</sup>.

[Stuttgart: Ferdinand Enke] und H. MEYER: Nachweis und Bestimmung organischer  
Julius Springer] u. a.)

| Salicyl-<br>aldehyd      | Zimtaldehyd              | Vanillin                   | Piperonal                   | Furfurol                   | Aceton                     |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 142—143 <sup>o</sup> (p) | 169—107 <sup>o</sup> (a) | 105 <sup>o</sup>           | 102—103 <sup>o</sup>        | 97—98 <sup>o</sup>         | —                          |
| 175,5 <sup>o</sup> (a)   | 143 <sup>o</sup>         | 145,5 <sup>o</sup> (x)     | 155 <sup>o</sup>            | —                          | 98—99 <sup>o</sup>         |
| 227 <sup>o</sup> (a)     | 194 <sup>o</sup> (a)     | 223 <sup>o</sup> (e)       | —                           | 137 <sup>o</sup>           | 148—148,5 <sup>o</sup> (a) |
| 248 <sup>o</sup> (a)     | 248 <sup>o</sup> (b)     | —                          | 265 <sup>o</sup> (x)        | 230 <sup>o</sup> (e, a)    | 128 <sup>o</sup> (a)       |
| —                        | —                        | —                          | —                           | —                          | 102 <sup>o</sup> (a)       |
| 200 <sup>o</sup>         | 203 <sup>o</sup>         | —                          | —                           | 201 <sup>o</sup>           | —                          |
| 208 <sup>o</sup> (a)     | 212—214 <sup>o</sup> (a) | 196—198 <sup>o</sup> (a)   | 177—178 <sup>o</sup> (a)    | 160 <sup>o</sup>           | —                          |
| 229 <sup>o</sup> (a)     | 215—216 <sup>o</sup> (w) | 232 <sup>o</sup> (e)       | 230—233 <sup>o</sup> (e)    | 197 <sup>o</sup>           | 190—191 <sup>o</sup> (m)   |
| 253—255 <sup>o</sup>     | 274 <sup>o</sup>         | 265 <sup>o</sup>           | 290 <sup>o</sup>            | 264 <sup>o</sup>           | 147 <sup>o</sup> (ac)      |
| 226 <sup>o</sup>         | —                        | 288 <sup>o</sup>           | 292 <sup>o</sup>            | 275 <sup>o</sup> (a)       | —                          |
| —                        | —                        | —                          | 172—173 <sup>o</sup> (ac)   | 128 <sup>o</sup>           | —                          |
| 177—178 <sup>o</sup> (a) | 196—197 <sup>o</sup> (e) | 222,5—223 <sup>o</sup> (n) | 201,5—202 <sup>o</sup> (bu) | 196—196,5 <sup>o</sup> (e) | —                          |

### b) Fällungsreaktionen.

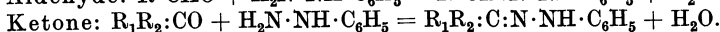
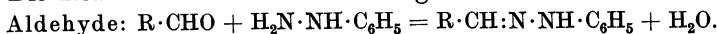
Sie beruhen teils auf Additionen, teils auf Kondensationen.

Von Additionsverbindungen kommen hauptsächlich solche mit Bisulfiten in Frage, ferner solche mit Kalium- und Erdalkalicyaniden<sup>2</sup>. Auch einige Ketone geben letztere Reaktionen. Aldehyde geben mit einer großen Anzahl von Stoffen charakteristische Umsetzungen. Unter Wasseraustritt entstehen Kondensationsprodukte, die z. Tl. sehr schwer löslich sind. Es kommen hauptsächlich folgende Stoffe in Frage: Phenylhydrazin, andere substituierte Hydrazine, Hydroxylamin, Semicarbazid, Semioxyamazid, Dimethylresorcin, Resorcin und Nitrohydroxylaminsäure.

α) Addition von Bisulfit<sup>3</sup>. Beim Schütteln eines Aldehyds mit einer konz. Lösung von Natriumbisulfit bilden sich Additionsprodukte  $(R \cdot CH \langle \begin{smallmatrix} OH \\ NaSO_3 \end{smallmatrix} \rangle)$ , die meist gut krystallisieren und daher zur Reinigung und Isolierung der Aldehyde dienen können. Da auch Nichtaldehyde (Ketone, Olefinalkohole, Indol usw.) in gleicher Weise reagieren können, zersetzt man zweckmäßig die gebildete Verbindung durch verd. Schwefelsäure oder Natronlauge und stellt mit der freigemachten Verbindung noch andere Aldehydreaktionen an.

β) Phenylhydrazin-Reaktion nach E. FISCHER<sup>4</sup>. Das Hydrazin verbindet sich mit den Aldehyden und Ketonen in dem Verhältnis gleicher Moleküle unter Austritt von Wasser zu festen oder öligen Kondensationsprodukten (Hydrazone), die im ersteren Falle durch eine Schmelzpunktbestimmung ein sehr gutes Hilfsmittel zur Identifizierung der betreffenden zu untersuchenden Substanz darbieten, während im letzteren Falle nur die allgemeine Frage entschieden wird, ob der fragliche Körper ein Aldehyd oder Keton ist.

Die Reaktionen verlaufen nach folgendem Schema:



Wesentlich für das Gelingen der Reaktion ist die Reinheit des zu verwendenden Hydrazinsalzes. Man stellt sich deshalb das am besten anzuwendende salzsaure Phenylhydrazin in der Weise dar, daß man die Base durch Vakuumdestillation (10—20 mm) von

<sup>1</sup> Die Krystallisation erfolgte aus: (a) Alkohol, (ac) Aceton, (b) Benzol, (bu) Butylalkohol, (e) Eisessig, (l) Ligroin, (m) Methylalkohol, (n) Nitrobenzol, (p) Petroläther, (w) Wasser, (x) Xylol.

<sup>2</sup> H. FRANZEN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1909, 42, 3293.

<sup>3</sup> BERTAGNINI: Ann. Chem. 1853, 85, 179, 268.

<sup>4</sup> E. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1884, 17, 572; Zeitschr. analyt. Chem. 1886, 25, 228.

Ammoniak befreit, sie dann in 10 Tln. Alkohol löst und mit konz. Salzsäure neutralisiert. Die abgeschiedene Krystallmasse wird abfiltriert, bis zur gänzlichen Entfärbung mit Alkohol und Äther gewaschen und auf dem Wasserbade getrocknet. Das so erhaltene Salz ist blendend weiß, absolut rein und hält sich in verschlossenen Gefäßen unverändert.

Die Kondensation der Aldehyde mit Hydrazin vollzieht sich am besten in ganz schwach essigsaurer Lösung; es empfiehlt sich deshalb am meisten die Verwendung einer jedesmal frisch zu bereitenden Lösung, die das Phenylhydrazinchlorhydrat mit der anderthalbfachen Gewichtsmenge von krystallisiertem Natriumacetat in 8—10 Tln. Wasser enthält. Man kann auch eine Lösung der freien Base in der gleichen Menge 50%iger Essigsäure verwenden, die man dann besonders gegen Ende des Versuches mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt.

Neben Phenylhydrazin eignet sich auch 2,4-Dinitro-phenylhydrazin als Reagens auf Aldehyde.

Zur Herstellung des Reagens verfährt man nach O. L. BRADY und G. V. ELSMIE<sup>1</sup>, wie folgt: 50 g 2,4-Dinitro-chlorbenzol werden in 750 ccm warmem Alkohol gelöst und portionsweise mit 100 ccm einer 50%igen Lösung von Hydrazinhydrat versetzt. Nach heftiger Reaktion beginnt sich sofort 2,4-Dinitro-phenylhydrazin auszuschleiden. Nach Abkühlung wird abgesaugt, mit kaltem Alkohol, dann mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Ausbeute an genügend reiner Substanz beträgt etwa 92%.

Die Darstellung der 2,4-Dinitro-phenylhydrazone erfolgt entweder in alkoholischer oder in wäßrig-salzsaurer Lösung. Zur Darstellung in alkoholischer Lösung werden 5 g Dinitro-phenylhydrazin in 150 ccm Alkohol suspendiert und mit 2 g des zu untersuchenden Aldehyds versetzt; die Mischung wird 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung krystallisiert das 2,4-Dinitro-phenylhydrazon aus. Es wird aus Alkohol umkrystallisiert.

Zur Darstellung in wäßrig-salzsaurer Lösung werden 4 g 2,4-Dinitro-phenylhydrazin in 25 ccm 2 N.-Salzsäure suspendiert und mit 20 ccm konz. Salzsäure versetzt; das gebildete Chlorhydrat wird in 1200 ccm 2 N.-Salzsäure gelöst. Darauf wird filtriert und mit 2 ccm des zu untersuchenden Aldehyds versetzt. Es erfolgt sofort Fällung des Dinitro-phenylhydrazons, das durch Schütteln in einigen Minuten in filtrierbare Fasern übergeführt wird.

Als weitere substituierte Hydrazine kommen noch in Betracht: p-Bromphenylhydrazin, p-Nitro-phenylhydrazin, Methyl-phenyl-, Benzyl-phenyl- sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphthylhydrazin.

Mikrochemischer Nachweis mit p-Nitrophenylhydrazinchlorid nach C. GRIEBEL<sup>2</sup>. Man bringt auf den Boden eines etwa 15 mm weiten und hohen Glasbecherchens *G* (Abb. 1) eine geringe Menge der auf Aldehyde zu prüfenden wäßrigen Lösung oder der festen Substanz *O* und bedeckt das Becherchen sofort mit einem Deckgläschen *D*, dessen Unterseite man vorher mit einem Tröpfchen des Reagens (*R*) beschießt hat. Als Reagens dient eine frisch bereitete und filtrierte Lösung einiger Körnchen von p-Nitrophenylhydrazinchlorid in einigen Tropfen etwa 15%iger Essigsäure. Das Becherchen bleibt dann einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen oder es wird 10—30 Sekunden auf der äußersten Ecke eines nur mäßig geheizten Wasserbades erwärmt. Das Vorhandensein von Aldehyden oder Ketonen erkennt man bereits mit der Lupe an der durch Kryställchen hervorgerufenen Trübung des Reagens, die stets zuerst am Rande des Flüssigkeitströpfchens auftritt. Man bringt das Deckglas mit der Flüssigkeit nach oben auf einen Objektträger und untersucht, am Rande des Tröpfchens beginnend, bei 100facher Vergrößerung. Beim Vorhandensein von Acetaldehyd zeigen sich mehr oder weniger zahlreiche, gelbe, nadelförmige Krystalle des Hydrazons; Aceton zeigt ähnliche Krystalle; Benzaldehyd bildet gelbbraune blattartige Krystallaggregate; Furfurol bildet braune Krystallbüschel, Formaldehyd keilförmig auslaufende Krystallaggregate.

Die Grenze der Nachweisbarkeit liegt für Formaldehyd bei etwa 30  $\gamma$ , für Acetaldehyd und Benzaldehyd bei 1  $\gamma$ , für Aceton bei 10  $\gamma$  in 1 ccm und für Furfurol bei 5  $\gamma$ .

<sup>1</sup> O. L. BRADY und G. V. ELSMIE: Analyst 1926, 51, 77; Zeitschr. analyt. Chem. 1927, 71, 211.

<sup>2</sup> C. GRIEBEL: Z. 1924, 47, 438.

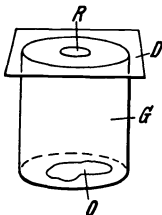
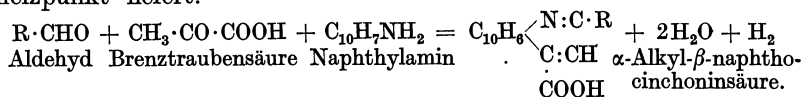


Abb. 1.

γ) Naphtho-cinchoninsäure-Reaktion nach O. DÖBNER<sup>1</sup>. Die Reaktion beruht auf der Bildung von α-Alkyl-β-naphthocinchoninsäuren bei Einwirkung von je 1 Mol Aldehyd, Brenztraubensäure und β-Naphthylamin in ätherischer oder alkoholischer Lösung. — Die Reaktion ist zur Charakterisierung eines Aldehyds sehr geeignet, da sie gut krystallisierende Produkte von scharfem Schmelzpunkt liefert.



Brenztraubensäure und der Aldehyd in geringem Überschuß (oder das aldehydhaltige Gemisch) werden in absol. Alkohol gelöst und zu der Mischung die Lösung des β-Naphthylamins in absol. Alkohol hinzugegeben, worauf etwa 3 Stunden am Rückflußkühler erhitzt wird. Nach dem Erkalten scheidet sich das Reaktionsprodukt aus und wird durch Waschen mit Äther gereinigt. Man kann auch in Ammoniak lösen und durch Neutralisieren wieder abscheiden.

Die α-Alkyl-β-naphtho-cinchoninsäuren können aus heißem Alkohol oder aus heißer Mischung von konz. Salzsäure und Alkohol (dann als Hydrochloride) umkrystallisiert werden. Die (gelben) Hydrochloride geben beim Kochen mit Wasser oder auf 120° erhitzt ihre Salzsäure ab. Die Schmelzpunkte der Säuren liegen zwischen 200 und 300° und sind für die einzelnen Aldehyde kennzeichnend, z. B. 283° für die α-Äthyl-Verbindung und 296° für die aus Benzaldehyd entstehende α-Phenylverbindung.

Aus den Säuren gehen durch Erhitzen über ihren Schmelzpunkt, die ebenfalls gut krystallisierenden α-Alkyl-β-naphthochinoline hervor.

Ist kein Aldehyd zugegen, so reagiert die Brenztraubensäure mit dem α-Naphthylamin unter partieller Spaltung in Acetaldehyd und Kohlendioxyd, und es entsteht bei der DÖBNERschen Reaktion α-Methyl-β-naphthocinchoninsäure (farblose Nadeln, Schmelzpunkt 310°), die beim Erhitzen in β-Naphthochinaldin (Schmelzpunkt 82°) übergeht. Dieselbe Reaktion tritt ein, wenn etwa Ketone oder andere nichtaldehydische Körper mit CO-Gruppen zugegen sind, so daß die Entstehung anderer α-Alkyl-β-naphthocinchoninsäuren beweisend für das Vorhandensein eines Aldehyds ist.

δ) Methon-(Dimethon-<sup>2</sup>) Reaktion nach D. VORLÄNDER<sup>3</sup>. Das von VORLÄNDER<sup>4</sup> entdeckte Methon (= 5,5-Dimethyl-dihydro-resorcin) C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> bietet vor den anderen Carbonylreagenzien den Vorteil, daß es in wäßrig-alkoholischer Lösung (bis etwa 100°) überhaupt nicht mit Ketonen reagiert. Mit Aldehyden dagegen liefert es schwer lösliche Kondensationsprodukte, deren Schmelzpunkte für die betreffenden Aldehyde charakteristisch sind. Durch starke Mineralsäuren wird die Fällung verzögert oder verhindert. In schwach saurer, neutraler und alkalischer Lösung ist das Methon anwendbar. In oxydativen Lösungen oder Mischungen kann das Methon zum Nachweis von Formaldehyd nicht angewendet werden. Die Fällungen sind auch mikrochemisch verwertbar.

Formaldehyd in wäßriger Lösung liefert mit überschüssiger wäßriger Methonlösung nach 10—20 Minuten einen Niederschlag von Formal-dimethon; Krystalle aus Alkohol vom Schmelzpunkt (korr.) 189°. — Acetaldehyd liefert mit gesättigter wäßriger Methonlösung nach mehrstündigem Stehen einen Niederschlag; Krystalle aus Alkohol vom Schmelzpunkt 139°. — Beim Zimtaldehyd entstehen je nach den Versuchsbedingungen 2 verschiedene Verbindungen. Beim Erwärmen einer Lösung von 2,8 g Methon in 80 ccm 50%igem Alkohol mit 1,3 g Zimtaldehyd entsteht ein krystallinischer Niederschlag; Krystalle aus

<sup>1</sup> O. DÖBNER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, 27, 352 und 2020.

<sup>2</sup> Die Bezeichnung „Dimedon“ ist von C. NEUBERG und E. REINFURTH (Biochem. Zeitschr. 1920, 106, 281) eingeführt. Die entsprechenden Aldehydverbindungen heißen Aldodimethone oder Aldomedone.

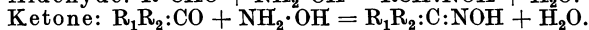
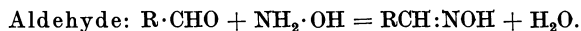
<sup>3</sup> D. VORLÄNDER: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, 77, 241. — Hier findet sich auch eine Vorschrift zur Darstellung des Methons.

<sup>4</sup> D. VORLÄNDER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, 30, 1801. — Liebigs Ann. 1897, 294, 252; 300, 370.

Alkohol Schmelzpunkt 208—210°, korr. 212—214°. Bei einer Temperatur von 10—15° scheidet sich aus einer Lösung von 2,8 g Methon und 1,3 g Zimtaldehyd in 80 ccm 50%igem Weingeist eine gelbe, blättrige Krystallmasse aus; Krystalle aus Alkohol Schmelzpunkt 158°, korr. 161°, bei weiterem Erhitzen tritt gegen 175° Trübung auf, die erst bei 205°, korr. 208°, einer völligen Klärung Platz macht. — p-Oxybenzaldehyd dimethon entsteht aus alkoholischer Lösung der Reagenzien bei Zimmertemperatur; Blättchen aus Alkohol Schmelzpunkt 188—190° (korr.). — Vanillaldimethon: Aus Alkohol kleine, farblose Tafeln vom Schmelzpunkt 196—198° (korr.). — Piperonaldimethon: Farblose, oktaederförmige Krystalle aus Alkohol; Schmelzpunkt 177—178°, Sinterung bei 175°. — Furfurolidimethon: Die Verbindung entsteht leicht beim Vermischen der warmen wäßrigen Lösungen. Aus 80%igem Alkohol krystallisieren weiße Nadeln; Schmelzpunkt 160° nach vorheriger Bräunung.

Mit wasserentziehenden Mitteln liefern die Kondensationsprodukte der Aldehyde, z. B. mit Essigsäureanhydrid am Rückflußkühler erwärmt, krystallisierende Anhydride.

e) Hydroxylamin-Reaktion nach V. MEYER und A. JANNY<sup>1</sup>. Aldehyde und Ketone gehen mit Hydroxylamin unter Aufnahme von je einem Atom Stickstoff und Wasserstoff in Aldoxime und Ketoxime über.

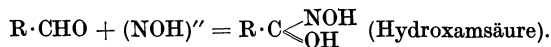
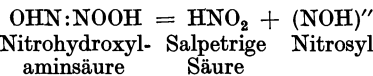


Zur Darstellung der Aldoxime läßt man auf die Aldehyde (1 Mol) eine wäßrige Lösung von Hydroxylaminchlorhydrat (1 Mol) und Natriumbicarbonat oder Kaliumacetat in der Kälte einwirken. Bei wasserunlöslichen Aldehyden arbeitet man in wäßrig-alkoholischer oder in methylalkoholischer Lösung.

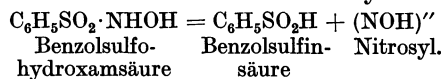
Bei den Ketoximen verwendet man 1½—2 Mol Hydroxylaminchlorhydrat und Lauge auf 1 Mol Substanz und läßt bei gewöhnlicher oder Wasserbadtemperatur einige Stunden einwirken.

Wendet man statt des Hydroxylamins neutralisiertes Hydroxylaminchlorhydrat oder -sulfat und neutralisierte Aldehyd- oder Ketonlösungen an (S. 1033), so kann man aus der Entstehung freier Säuren (gegen Methylorange) auf die Gegenwart von Aldehyden oder Ketonen schließen.

ζ) Nitro-hydroxylaminsäure- und Benzol-sulfohydroxamsäure-Reaktion. Nach A. ANGELI<sup>2</sup> bildet Nitro-hydroxylaminsäure mit aliphatischen und aromatischen Aldehyden Hydroxamsäuren, wobei die erstere unter Bildung von Nitrosyl zerfällt, das mit den Aldehyden in Reaktion tritt:



Auch die von PILOTY<sup>3</sup> dargestellte Benzolsulfo-hydroxamsäure zerfällt in alkalischer Lösung in Benzolsulfinsäure und Nitrosyl:



Die Hydroxamsäuren geben mit Eisenchlorid eine sehr charakteristische rotviolette Färbung und mit Kupferacetat grüne oder hellblaue Färbungen; die Hydroxamsäuren der Aldehyde sind ferner durch ihre Schmelzpunkte charakterisiert (S. 1024). Die Reagenzien werden in folgender Weise dargestellt:

Nitro-hydroxylaminsäure. Man gibt zu einer möglichst konz. Lösung von 3 Atomen Natrium in absolutem Alkohol eine siedende alkoholische Lösung von 1 Mol Hydroxylaminhydrochlorid. Das entstandene Natriumchlorid wird sofort mit der Saugpumpe abfiltriert und zu der erhaltenen klaren Flüssigkeit ein Molekül Äthylnitrit gegeben. Wenn nötig,

<sup>1</sup> V. MEYER u. A. JANNY: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1882, 15, 1324, 1525; 1883, 16, 494 (E. NAEGELI).

<sup>2</sup> ANGELI-ARNDT: Sauerstoffhaltige Verbindungen des Stickstoffs 1913; L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen, S. 112. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

<sup>3</sup> PILOTY: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1896, 29, 1559.

kühlt man das Reaktionsgefäß in Wasser. Das sich ausscheidende weiße Pulver wird gesammelt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

**Benzol-sulfohydroxamsäure.** Man löst 130 g Hydroxylaminchlorhydrat heiß in 45 ccm Wasser und läßt, bevor diese Lösung erkaltet ist, dazu eine Lösung von 42,5 g Natrium in 600 ccm absol. Alkohol in langsamem Strome einfließen, so daß kein Aufkochen eintritt. Nach dem Erkalten filtriert man vom ausgeschiedenen Natriumchlorid ab, verdünnt die Lösung mit weiteren 600 ccm Alkohol und trägt allmählich unter Umschütteln 100 g Benzolsulfochlorid ein, wobei etwas Gasentwicklung und ziemlich starke Erwärmung auftritt. Man verdampft den Alkohol auf dem Wasserbade. Der krystallinische Rückstand bzw. der Krystallbrei wird dreimal mit je 200 ccm absolutem Äther extrahiert, nach dessen Verdunstung die Benzol-sulfohydroxamsäure als farblose krystallinische Masse hinterbleibt. Man wäscht auf Tontellern mit Chloroform und krystallisiert einmal aus Wasser um. Schmelzpunkt etwa 126°.

**Reaktion mit Nitro-hydroxylaminsäure<sup>1</sup>.** Zur wäßrigen Lösung von 1 Mol Nitro-hydroxylaminsäurem Natrium fügt man 1 Mol des Aldehyds und nötigenfalls soviel Alkohol, daß die Flüssigkeit homogen ist. Falls die Reaktion nicht sofort unter Wärmeentwicklung eintritt, erwärmt man auf dem Wasserbade, bis der Aldehydgeruch verschwunden ist, verjagt den Alkohol und versetzt die zurückbleibende Flüssigkeit bei aromatischen Aldehyden mit Bariumchlorid. Die dadurch bewirkte Fällung des Bariumsalzes wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und dann mit Salzsäure behandelt, worauf die Hydroxamsäure frei wird. Die Hydroxamsäuren geben auch in den geringsten Mengen mit Eisenchlorid eine charakteristische rotviolette Färbung und mit Kupferacetat grüne oder hellblaue Fällungen.

Sind die Bariumsalze in Wasser löslich, so verwendet man, zumal die gebildete Salpetrige Säure leicht stören kann, besser die nachstehende Reaktion.

**Reaktion mit Benzol-sulfohydroxamsäure<sup>2</sup>.** 1 Mol der Säure und 1 Mol Aldehyd werden mit Kalilauge bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt. Nach Beendigung der Reaktion verjagt man den Alkohol auf dem Wasserbade, säuert den Rückstand mit Essigsäure an und versetzt mit Kupferacetat. Das unlösliche Kupfersalz fällt aus und wird nach reichlichem Waschen mit Wasser mit verd. Mineralsäure oder nach Aufschwemmen in absol. Alkohol durch Schwefelwasserstoff zersetzt.

η) **Reaktion mit Barbitursäure.** Zum Nachweis von aromatischen und Furfuraldehyden ist die Barbitursäure  $(\text{CH}_2 < \begin{smallmatrix} \text{CO} \cdot \text{NH} \\ \text{CO} \cdot \text{NH} \end{smallmatrix} > \text{CO})$  besonders geeignet, zumal sie nicht mit Ketonen reagiert und daher zur Trennung der Aldehyde von diesen dienen kann. Die Barbitursäure-Kondensationsprodukte sind aber nicht zur Identifizierung der einzelnen Aldehyde geeignet, weil sie keine scharfen Schmelzpunkte zeigen, sondern sich beim Erhitzen zersetzen. Dagegen ist nach S. AKABORI<sup>3</sup> die in Wasser und organischen Lösungsmitteln leicht lösliche 1,3-Dimethyl-barbitursäure<sup>4</sup> hierfür<sup>5</sup> sehr geeignet, weil sie leicht krystallisierende Kondensationsprodukte mit scharfen Schmelzpunkten (Tabelle auf S. 1024) bildet: Man erhitzt eine wäßrige oder wäßrig-alkoholische Lösung der Komponenten einige Minuten auf dem siedenden Wasserbade; beim Verdünnen mit Wasser scheiden sich die Kondensationsprodukte fast vollständig aus.

<sup>1</sup> Vgl. auch F. ANGELICO u. S. FANARA: Gazz. chim. Ital. 1901, **31**, II, 15; C. 1901, II, 770.

<sup>2</sup> Nach A. ANGELI bei L. ROSENTHALER. — Vgl. auch E. RIMINI: Atti R. Accad. Lincei (Roma), Rend. 1901, [5] **10** I, 355; C. 1901, II, 99.

<sup>3</sup> S. AKABORI: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1933, **66**, 139. — Vgl. auch Proceed. Imp. Acad. Tokyo 1927, **3**, 342; C. 1927, II, 1962.

<sup>4</sup> Die 1,3-Dimethyl-barbitursäure  $(\text{H}_2\text{C} < \begin{smallmatrix} \text{CO} \cdot \text{N} < \text{CH}_3 \\ \text{CO} \cdot \text{N} < \text{CH}_3 \end{smallmatrix} > \text{CO})$  wird nach dem Verfahren von

H. BILTZ und WITTEK (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1921, **54**, 1037) dargestellt.

<sup>5</sup> Für die Identifizierung aliphatischer Aldehyde ist das Verfahren ungeeignet, weil die krystallinischen Kondensationsprodukte keine scharfen Schmelzpunkte zeigen.

ð) Sonstige Aldehyd-Reaktionen. Reaktionen mit Semicarbazid (THIELE<sup>1</sup>), Semioxamazid (KERP und UNGER<sup>2</sup>), Thiosemicarbazid, Resorcin (MICHAEL und RYDER<sup>3</sup>), p-Nitro-benzyl-mercaptan (SCHAEFFER und MURŪA<sup>4</sup>), Phenylhydrazin und Diazolösung (E. PITTARELLI<sup>5</sup>). — J. M. KOREMAN<sup>6</sup> beschreibt Tropfenreaktionen mit verschiedenen Reagenzien auf Filtrierpapier.

### c) Farbenreaktionen.

α) Fuchsinbisulfit-Reaktion. Für den allgemeinen Nachweis von Aldehyden verwendet man das SCHIFFSche Reagens, das sich von dem Reagens für den eindeutigen Formaldehydnachweis (S. 1039) durch einen geringeren Säuregehalt unterscheidet. Je geringer der Überschuß an Schwefeldioxyd ist, desto empfindlicher ist die Reaktion.

Darstellung des Reagens. Nach SCHIFF<sup>7</sup> leitet man in eine 0,025%ige Fuchsinlösung so lange Schwefeldioxyd ein — oder gibt die entsprechende Menge wäßriger Natriumbisulfitlösung hinzu —, bis die Flüssigkeit nur noch schwach gelb gefärbt ist, oder man gibt 20 ccm 27%ige Natriumbisulfitlösung zu 1 Liter 0,1%iger Fuchsinlösung, worauf die Lösung etwa nach 1 Stunde entfärbt ist. Sodann setzt man 10 ccm konz. Salzsäure hinzu und läßt einige Tage in verschlossener Flasche stehen. — Nach E. P. PHELPS und A. W. ROWE<sup>8</sup> stellt man das Reagens her, indem 30 ccm wäßrige Fuchsinlösung mit 200 ccm gesättigter Schwefeldioxydlösung und mit 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure gemischt werden. Nach 24 Stunden ist die nötigenfalls filtrierte Lösung gebrauchsfertig.

Mischt man wenige Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 1—2 ccm des Reagens und schüttelt kurze Zeit in dem verschlossenen Reagensglase, so tritt bei Anwesenheit von Aldehyden eine starke Rot- bis Rotviolettfröbung ein.

Die Reaktion tritt auch mit Aceton und einigen anderen Ketonen sowie mit Oxydationsmitteln ein und wird durch Alkalien aufgehoben; einige Phenolaldehyde geben sie nicht.

β) Nitroprussidnatrium-Reaktion nach B. v. BITTÓ<sup>9</sup>. Nitroprussidnatrium gibt in alkalischer Lösung mit den Aldehyden und Ketonen der Fettreihe eine Rotfröbung, wenn die Aldehydgruppe CHO oder die Carbonylgruppe CO unmittelbar wenigstens mit einer nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehenden Gruppe verbunden ist.

Zur Ausführung der Reaktion fügt man zu der zu prüfenden Lösung 0,5 bis 1 ccm einer frisch bereiteten, 0,3—0,5%igen, Nitroprussidnatriumlösung hinzu und macht dann mit etwa 15%iger Kalilauge schwach alkalisch. Formaldehyd gibt die Reaktion nicht.

γ) Tryptophan-Reaktion. Diese von O. HEHNER<sup>10</sup> entdeckte Reaktion wird unter Anwendung der von N. LEONARD und H. M. SMITH<sup>11</sup> vorgeschlagenen Salzsäure an Stelle von Schwefelsäure in folgender Weise<sup>12</sup> ausgeführt: 5 ccm der Untersuchungsflüssigkeit werden mit 2 ccm frischer Milch oder wenig Pepton

<sup>1</sup> THIELE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, **27**, 1918.

<sup>2</sup> KERP u. UNGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 585.

<sup>3</sup> MICHAEL u. RYDER: Amer. Chem. Journ. **9**, 134; Zeitschr. analyt. Chem. 1888, **27**, 513.

<sup>4</sup> SCHAEFFER u. MURŪA: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1907, **40**, 2007.

<sup>5</sup> E. PITTARELLI: Arch. Farmacol. sperim. 1920, **29**, 70 u. **30**, 148; C. 1920, IV, 616 u. 1921, IV, 1079. — Vgl. auch H. LEFFMANN: Amer. Journ. Pharmac. 1924, **96**, 507; C. 1924, II, 2604.

<sup>6</sup> J. M. KOREMAN: Journ. Chem. Ind. (russ.) 1931, **8**, 508; C. 1931, II, 601.

<sup>7</sup> SCHIFF: Ann. Chemie u. Pharm. **140**, 93. — Vgl. B. v. BITTÓ: Zeitschr. analyt. Chem. 1897, **36**, 373.

<sup>8</sup> E. P. PHELPS u. A. W. ROWE: Journ. Amer. Chem. Soc. 1926, **48**, 1049; C. 1926, I, 3565.

<sup>9</sup> B. v. BITTÓ: Liebigs Ann. **267**, 372; Zeitschr. analyt. Chem. 1893, **32**, 347.

<sup>10</sup> O. HEHNER: Analyst 1896, **21**, 94; C. 1896, I, 1145.

<sup>11</sup> N. LEONARD u. H. M. SMITH: Analyst 1899, **24**, 86.

<sup>12</sup> Vgl. H. MEYER: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen, S. 47. Berlin: Julius Springer 1933. Dasselbst findet sich auch eine Zusammenstellung der umfangreichen Literatur über die Tryptophanreaktion.

(WITTE) und 7 ccm eisenhaltiger Salzsäure (auf 100 ccm 25%iger Salzsäure 0,2 ccm 10%iger Eisenchloridlösung)  $\frac{1}{2}$  Minute — nach anderen Angaben 1 Minute — lang zum schwachen Sieden erhitzt. Bei Gegenwart von Aldehyden tritt Violettfärbung ein. G. W. HEIMROD und P. A. LEVENE<sup>1</sup> versetzen 1 ccm der Untersuchungsflüssigkeit mit 1–2 ccm Phosphorsäure (D = 1,7) und einem Tropfen einer schwachen Lösung von Tryptophan<sup>2</sup> (oder auch Casein, Eiweiß, Pepton) in Phosphorsäure und einem Tropfen einer 5%igen Eisenchloridlösung und unterschichten die kalte Lösung mit konz. Schwefelsäure. Bei Gegenwart von Aldehyden tritt Violettfärbung ein. Tritt die Reaktion in der von HEHNER angestellten Weise, d. h. ohne Phosphorsäure, nicht ein, dagegen wohl nach HEIMROD und LEVENE, so ist nach Angabe dieser Autoren Formaldehyd ausgeschlossen.

δ) Diazobenzolsulfosäure-Reaktion nach E. FISCHER und PENZOLDT<sup>3</sup>. Aldehyde geben mit einer alkalischen Lösung von Diazobenzolsulfosäure nach einiger Zeit eine rote Färbung, die beim Stehen allmählich in Violett übergeht.

Man löst jedesmal frisch 1 g krystallisierte reine Diazobenzolsulfosäure in 60 ccm kaltem Wasser und etwas Natronlauge, gibt die zu prüfende Substanz und einige Körnchen Natriumamalgam hinzu und läßt die Mischung stehen. Ist ein Aldehyd zugegen, so zeigt sich nach 10–20 Minuten die rotviolette Färbung. Rotfärbung tritt noch ein mit Ketokörpern (Aceton, Acetessigester) und Phenolen, und zwar bei beiden auch ohne Zusatz von Natriumamalgam.

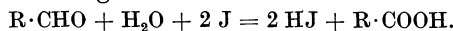
ε) Sonstige Reaktionen. Reaktionen mit m-Dinitrobenzol und Pikrinsäure (B. v. BITTÓ<sup>4</sup>), mit Benzidin (P. N. VAN ECK<sup>5</sup>), mit Sulfanilsäure und Naphthionsäure (P. POOTH<sup>6</sup>), mit Resorcin und Phloroglucin (E. V. LYNN und F. A. LEE<sup>7</sup>).

## 2. Bestimmung von Aldehyden.

Wenn in der zu untersuchenden Substanz nur ein einzelner Aldehyd vorhanden ist, so kann seine Bestimmung nach folgenden Verfahren erfolgen:

### a) Verfahren von J. BOUGAULT und R. GROS<sup>8</sup>.

Die Reduktion von NESSLERS Reagens durch Aldehyde und Ketone (S. 1024) kann auch zur Bestimmung der Aldehyde dienen; diese werden hierbei zu den entsprechenden Säuren oxydiert. Die mit dem Reagens behandelten Lösungen verbrauchen Jod in einer dem Oxydationswert des betreffenden Aldehyds äquivalenten Menge:



Die Bestimmung wird so ausgeführt, daß man eine etwa 0,001–0,05 g Aldehyd enthaltende Lösung mit 30 ccm Reagens und 10 ccm Lauge versetzt, mit Salzsäure neutralisiert, 0,1 N.-Jodlösung im Überschuß zugibt und mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung zurücktitriert. Sehr gut lassen sich so bestimmen: Formaldehyd, Furfurol, Benzaldehyd und Piperonal. Bei Vanillin treten Nebenreaktionen ein, die eine Anwendung dieser Methode nicht gestatten. Zu beachten ist, daß jeder Aldehyd eigene Versuchsbedingungen erfordert. Mit

<sup>1</sup> G. W. HEIMROD u. P. A. LEVENE: Biochem. Zeitschr. 1910, 25, 18.

<sup>2</sup> Die Verwendbarkeit von Milch, Pepton, Casein und anderen Proteinen beruht auf deren Tryptophangehalt. Die kein Tryptophan enthaltende Gelatine ist daher nicht verwendbar.

<sup>3</sup> E. FISCHER u. PENZOLDT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1883, 16, 657.

<sup>4</sup> B. v. BITTÓ: Ann. Chem. 269, 377; Zeitschr. analyt. Chem. 1893, 32, 347; 1897, 36, 369.

<sup>5</sup> P. N. VAN ECK: Pharm. Weekbl. 1923, 60, 1204; C. 1924, I, 434.

<sup>6</sup> P. POOTH: Schweiz. Apoth.-Ztg. 1916, 54, 377; C. 1916, II, 522.

<sup>7</sup> E. V. LYNN u. F. A. LEE: Journ. Amer. Pharmac. Assoc. 1923, 12, 418; C. 1923, IV, 353.

<sup>8</sup> J. BOUGAULT u. R. GROS: Bull. Soc. chim. France 1922, [4] 31, 1348; C. 1923, IV, 702.



Ausnahme von Methylalkohol wirkt die Anwesenheit von Alkoholen und organischen Verunreinigungen störend. Ketone stören die Bestimmung nicht.

### b) Verfahren von M. RIPPER<sup>1</sup>.

Die Fähigkeit der Aldehyde mit Bisulfit Additionsprodukte zu bilden (S. 1025), kann auch zu ihrer Bestimmung benutzt werden. Man verwendet eine Bisulfitlösung von bekanntem Gehalt und titriert das nicht an den Aldehyd gebundenen Schwefeldioxyd<sup>2</sup> jodometrisch.

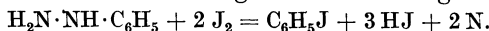
Man wendet etwa 0,5%ige, womöglich wäßrige Lösungen des Aldehyds an. 25 ccm dieser verdünnten Aldehydlösung läßt man in ein 150 ccm-Kölbchen einlaufen, in welchem sich 50 ccm einer Kaliumbisulfitlösung, die 12 g Kaliumbisulfit im Liter enthält, befinden. Man läßt alsdann das mit einem Korkstopfen verschlossene Kölbchen etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde stehen. Unterdessen bestimmt man den Titer von 50 ccm der Bisulfitlösung mittels 0,1 N.-Jodlösung. Es seien  $a$  ccm verbraucht worden. In gleicher Weise titriert man alsdann die nicht gebundene Schweflige Säure in dem angesetzten Versuch. Wurden zum Zurücktitrieren  $b$  ccm 0,1 N.-Jodlösung verbraucht, so beträgt, wenn  $M$  das Molekulargewicht des vorhandenen Aldehyds ist, seine Menge in den angewandten 25 ccm der Aldehydlösung:  $x = (a - b) \frac{M}{20\,000}$ .

In Wasser unlösliche Aldehyde bringt man unter Zuhilfenahme von Alkohol in Lösung. Bei der Ausführung der Bestimmung ist zu berücksichtigen, daß in Lösungen, die mehr als 5% Alkohol enthalten, die Jodstärkereaktion ausbleibt. Für die Herstellung der nur etwa 0,5%igen Aldehydlösung wird man jedoch mit geringen Alkoholzusätzen auskommen. Im anderen Falle wird Verdünnen mit ausgekochtem Wasser vor dem Zurücktitrieren auch zum Ziele führen.

Außer dem Acetaldehyd (RIPPER) können nach B. G. FEINBERG<sup>3</sup> mittels der Bisulfitmethode Formaldehyd genau, Vanillin und Benzaldehyd annähernd bestimmt werden, während bei Salicylaldehyd und p-Oxybenzaldehyd die Ergebnisse praktisch wertlos sind.

### c) Phenylhydrazinverfahren.

Dieses auf der Bildung von Kondensationsprodukten der Aldehyde (und Ketone) mit Phenylhydrazinen beruhende jodometrische Verfahren (S. 1025) wurde von E. v. MEYER<sup>4</sup>) ausgebildet. Es beruht auf der Kondensation des Aldehyds (Ketons) mit einer gemessenen Menge Phenylhydrazin und der Rücktitration der nicht verbrauchten Menge des letzteren mittels Thiosulfatlösung. Die Reaktion mit Jod beruht auf folgender Umsetzung:



$\alpha$ ) L. LAUTENSCHLÄGER<sup>5</sup> läßt bei aromatischen Aldehyden die Mischung von etwa 1 g des Aldehyds mit einer überschüssigen Menge Hydrazinsulfatlösung von bekanntem Gehalt einige Stunden unter öfterem Umschütteln stehen, filtriert von dem entstandenen Niederschlag ab, füllt das Filtrat auf ein

<sup>1</sup> M. RIPPER: Monatsh. Chem. 1900, **21**, 1079; C. 1901, I, 477. — Vgl. auch J. WAGNER: Biochem. Zeitschr. 1928, **194**, 440.

<sup>2</sup> Y. TOMODA (Journ. Soc. chem. Ind. 1929, **48**, 76 T; Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 453) hat ein Verfahren zur unmittelbaren Titration des an Aldehyd gebundenen Schwefeldioxyds beschrieben.

<sup>3</sup> B. G. FEINBERG: Amer. Chem. Journ. 1913, **49**, 87; C. 1913, I, 1462. — Vgl. ferner G. ROMEO u. E. D'AMICO: Ann. Chim. appl. 1925, **15**, 320; C. 1926, I, 1603.

<sup>4</sup> E. v. MEYER: Journ. prakt. Chem. 1887 [6], **36**, 115.

<sup>5</sup> L. LAUTENSCHLÄGER: Arch. Pharm. 1918, **256**, 81; C. 1918, II, 223.

bestimmtes Volumen auf, versetzt eine abgemessene Menge mit überschüssiger Jodlösung, macht mit Natronlauge alkalisch, säuert nach beendeter Stickstoffentwicklung mit verd. Schwefelsäure wieder an und titriert den Jodüberschuß mit Thiosulfatlösung zurück. Das Verfahren wurde bei Benzaldehyd, Zimt-aldehyd, Vanillin und anderen aromatischen Aldehyden angewandt.

Bei aliphatischen Aldehyden und bei Ketonen ist das Verfahren nicht anwendbar.

E. G. R. ARDAGH und J. G. WILLIAMS<sup>1</sup> führen das Verfahren, wie folgt, aus: Je 20 ccm einer 0,5 molaren Lösung von Phenylhydrazinchlorhydrat (dunkel aufzubewahren) und einer etwas schwächer als 0,5 molaren Dinatriumphosphatlösung<sup>2</sup> werden in einem 100 ccm-Kolben mit etwa 0,5 Äquivalent des Aldehyds, gelöst in Wasser oder wäßrigem Alkohol, gemischt und mit gesättigter Natriumchloridlösung<sup>3</sup> aufgefüllt. Die Reaktion ist im allgemeinen nach 30 Minuten beendet. Ein etwaiger Niederschlag wird möglichst rasch abfiltriert. 25 ccm der wäßrigen Lösung werden in einem Scheidetrichter (75—100 ccm fassend) mit 4—5 ccm Petroläther (40—60°) 2 Minuten kräftig geschüttelt<sup>3</sup>. Nach 2 Minuten wird ein Teil der wäßrigen Lösung in einen 25 ccm-Meßzylinder abgelassen. 10 ccm der Lösung (immer in Stickstoffatmosphäre!) werden in einen 250 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit eingeschlif-fenem Glasstopfen abpipettiert und nach Zusatz von 2 Tropfen Methylorange-lösung (0,1%) mit verd. Salz- oder Schwefelsäure bis zur schwachen Rosafärbung neutralisiert. Nun werden 0,1 N.-Jodlösung (5 ccm Überschuß), nach 5 Minuten frische Stärkelösung und darauf 3—4 ccm Überschuß an 0,1 N.-Thiosulfatlösung und 5 ccm Äther zugesetzt und geschüttelt. Dann wird mit 0,1 N.-Jodlösung zurücktitriert. Die Volumen der restlichen wäßrigen und ätherischen Lösungen werden gemessen. Gleichzeitig wird ein Leerversuch mit Phenylhydrazinchlorhydrat allein ausgeführt. Kontrollversuche mit Acetaldehyd, Benzaldehyd und Aceton ergaben sehr gute Übereinstimmung.

β) BENEDICT und STRACHE<sup>4</sup> bestimmen das bei der Kondensation nicht verbrauchte Phenylhydrazin durch Oxydation mit FEHLINGScher Lösung und messen den dabei entwickelten Stickstoff.

#### d) Verfahren von B. G. FEINBERG<sup>5</sup>.

Das Verfahren beruht auf der Wägung der Kondensationsprodukte der Aldehyde mit p-Nitrophenylhydrazin. Man stellt eine etwa 1%ige Lösung des Aldehyds in 12%iger Essigsäure her. 25 ccm dieser Lösung werden mit 50 ccm Wasser und 30 ccm 30%iger Essigsäure versetzt, die ungefähr die doppelte der zur Fällung erforderlichen Menge p-Nitrophenylhydrazin enthält. Nach 5stündigem Stehen wird durch einen GOOCH-Tiegel filtriert, mit 10%iger Essigsäure ausgewaschen, bis verd. Alkali nur noch schwach färbt, und bei 105—110° getrocknet. Zur Berechnung der einzelnen Aldehyde multipliziert man die gewogene Menge Hydrazon mit den folgenden Faktoren: Benzaldehyd 0,4400, Salicylaldehyd und p-Oxybenzaldehyd 0,4747, Vanillin 0,5353.

Die Bestimmung des Benzaldehyds nach dieser Methode liefert Werte, die auf 99% genau sind. Etwas weniger genau sind die Werte beim Salicylaldehyd. Bei Vanillin erhält man theoretische Werte, wenn man die mit 75 ccm Wasser verdünnte Aldehydlösung tropfenweise mit einer Lösung von p-Nitrophenylhydrazin in sehr verdünnter, etwa N.-Salzsäure versetzt.

#### e) Hydroxylaminverfahren.

Das Verfahren beruht darauf, daß bei der Einwirkung von Aldehyden — auch von Ketonen — auf Hydroxylaminchlorhydrat oder -sulfat neben der

<sup>1</sup> E. G. R. ARDAGH u. J. G. WILLIAMS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1925, 47, 2976 u. 2983; C. 1926, I, 1636 u. 1677.

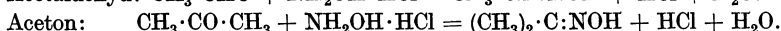
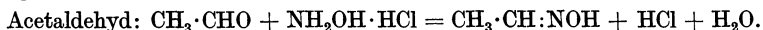
<sup>2</sup> Die Anwendung der Dinatriumphosphatlösung dient zur Konstanthaltung der H<sup>+</sup>-Konzentration und das Arbeiten in Stickstoffatmosphäre zur Vermeidung der Oxydation des Phenylhydrazins.

<sup>3</sup> Der Zusatz erfolgt zur Aussalzung des Hydrazons und die Ausschüttlung mit Petroläther zu dessen Entfernung aus der wäßrigen Lösung.

<sup>4</sup> BENEDICT u. STRACHE: Monatsh. Chem. 1893, 14, 270.

<sup>5</sup> B. G. FEINBERG: Amer. Chem. Journ. 1913, 49, 87; C. 1913, I, 1462.

Aldoxim- bzw. Ketoximbildung eine dem Aldehyd bzw. Keton äquivalente Menge Säure frei wird, z. B.:



α) Nach A. BROCHET und R. CAMBIER<sup>1</sup> setzt man zu der neutralen Aldehyd- bzw. Ketonlösung 10 ccm einer gegen Methylorange neutralisierten Lösung von Hydroxylaminchlorhydrat (oder -sulfat), läßt eine Stunde bei 30—37° stehen und titriert die freigewordene Säure mit 0,1 N.-Natronlauge.

Das Verfahren liefert bei Acetaldehyd nach C. NEUBERG und A. GOTTSCHALK<sup>2</sup> etwa um 9—10% zu niedrige Ergebnisse.

β) A. H. BENNETT<sup>3</sup> hat das Verfahren von J. WALTHER<sup>4</sup> etwas abgeändert und verfährt, namentlich bei aromatischen Aldehyden (Benzaldehyd, Zimt-aldehyd, Citral usw.) und bei Ketonen, wie folgt:

Eine etwa 0,5—1 g Aldehyd enthaltende alkoholische Lösung wird mit 20 ccm 0,5 N.-Lösung von durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigtem Hydroxylaminchlorhydrat in 80%igem Alkohol, 8 ccm alkoholischer 0,5 N.-Kalilauge und 20 ccm hochprozentigem Alkohol  $\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler zum leichten Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird unter Ausspülen des Rückflußkühlers mit 250 ccm Wasser verdünnt und gegen Phenolphthalein neutralisiert. Die Flüssigkeit wird sodann mit 0,5 N.-Schwefelsäure unter Anwendung der Tüpfelprobe gegen Methylorange neutralisiert. Die so verbrauchten ccm 0,5 N.-Schwefelsäure, abgezogen von den im Leerversuch ohne Aldehyd für die Hydroxylaminlösung verbrauchten ccm 0,5 N.-Säure, entspricht der in Reaktion getretenen Menge Hydroxylaminchlorhydrat.

Bei Formaldehyd und Aceton genügt statt des Kochens 2 Stunden Stehen bei Zimmer-temperatur; auch bei den höheren Aldehyden genügt diese Einwirkung, wenn man die doppelte Menge Alkohol anwendet und dadurch die Aldehyde in Lösung hält.

γ) Nach J. WALTHER kann man die Bestimmung auch jodometrisch ausführen, indem man das Oximierungsprodukt auf ein bestimmtes Volumen auffüllt, 25 ccm der filtrierten Lösung mit 1 g Natriumbicarbonatlösung und mit 0,1 N.-Jodlösung versetzt und den Überschuß an Jodlösung mit 0,1 N.-Hypo-sulfidlösung zurücktitriert. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung entspricht dann  $\frac{1}{2}$  Mol Hydroxylamin.

#### f) Argentometrische Verfahren von W. PONNDORF<sup>5</sup>:

Die Verfahren beruhen darauf, daß Silberoxyd in Gegenwart von Wasser durch Aldehyde zu Silber reduziert wird. Formaldehyd und Acetaldehyd werden dabei schnell oxydiert, während bei den höheren aliphatischen Aldehyden mit wachsender Kohlenstoffkette die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt; Benzaldehyd wird nur langsam oxydiert.

α) Verfahren für Formaldehyd und Acetaldehyd. In einen 100 ccm-Meßkolben gibt man 0,5 ccm N.-Magnesiumsulfatlösung<sup>6</sup>, 25 ccm 0,1 N.-Silber-

<sup>1</sup> A. BROCHET u. R. CAMBIER: Compt. rend. Paris 1895, 120, 449; C. 1895, I, 683. — Vgl. auch R. SIEBER: Chem.-Ztg. 1921, 45, 349. — J. WAGNER: Biochem. Zeitschr. 1928, 194, 440.

<sup>2</sup> C. NEUBERG u. A. GOTTSCHALK: Biochem. Zeitschr. 1924, 146, 164.

<sup>3</sup> A. H. BENNETT: Analyst 1909, 34, 14; vgl. ferner A. H. BENNETT u. F. K. DONOVAN: Analyst 1922, 47, 146.

<sup>4</sup> J. WALTHER: Pharm. Zentralh. 1899, 40, 621.

<sup>5</sup> W. PONNDORF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1931, 64, 1913.

<sup>6</sup> Die Magnesiumsulfatlösung wird zugesetzt, um durch das daraus ausgeschiedene Magnesiumhydroxyd eine Vergrößerung der wirksamen Oberfläche des Silberoxyds und damit eine stärkere Oxydationswirkung herbeizuführen.

nitratlösung<sup>1</sup> und 10 ccm der zu untersuchenden 5–45 mg Aldehyd enthaltenden Lösung. Dazu fügt man unter Umschwenken schnell 13 ccm (Theorie + 0,5 ccm Überschuß) 0,2 N.-Natronlauge. Nach dem Aufsetzen des Glasstopfens wird sofort 5 Minuten kräftig geschüttelt. Nach weiterer Zugabe von 6 ccm 0,2 N.-Natronlauge wird nochmals 5 Minuten geschüttelt. Der Stopfen wird nach dem Abnehmen mit 1 ccm Wasser abgespült. Dann gibt man 5 ccm N.-Kalilauge (unter dauerndem Schwenken in Absätzen von 1 ccm nach je 10 Sekunden) zu und schwenkt 2 Minuten lang um. Hiernach neutralisiert man stufenweise mit 5 ccm 20%iger Schwefelsäure. Bei 20° füllt man auf 100 ccm auf und verwendet von der filtrierten Lösung (die ersten 20 ccm Filtrat werden verworfen) 50 ccm zur Bestimmung des noch vorhandenen Silbers. Die 50 ccm des Filtrates werden mit 0,1 N.-Kaliumjodidlösung übertitriert und nach Zugabe einer Titrationsbasis (20 ccm Wasser, 2 ccm 0,002 N.-Jod-Kaliumjodidlösung, 2 ccm 1%ige Stärkelösung mit 0,002 N.-Silbernitratlösung entfärbt) mit 0,1 N.-Silbernitratlösung zurücktitriert. Für genauere Bestimmungen (über 0,5%) muß der Nullwert ermittelt und abgezogen werden.

β) Verfahren für Propionaldehyd bis Benzaldehyd. Bei diesen langsamer reagierenden Aldehyden verfährt man, wie folgt: In einem 250 ccm-Kolben werden 50 ccm Aldehydlösung und 45–50 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung unter Umschwenken mit 12 ccm 0,1 N.-Barytlauge und 67 ccm 0,1 N.-Natronlauge versetzt und 2 Minuten geschüttelt. Dann schüttelt man 5 Minuten im siedenden Wasserbade, wobei man den Kolben nach und nach tiefer eintaucht und die Flüssigkeit durch stoßweises Rotieren kräftig schüttelt. Nach Zugabe von 10 ccm N.-Kalilauge wird 5 Minuten im Wasserbade weitergeschüttelt. Darauf wird nach Zugabe von 10 ccm 50%iger Kalilauge nochmals 5 Minuten im Wasserbade geschüttelt. Nach dem Abkühlen und Zusatz von 15 ccm 50%iger Schwefelsäure wird bei 20° auf 250 ccm aufgefüllt. Nach dem Filtrieren werden 200 ccm mit 0,1 N.-Kaliumjodid- und Silbernitratlösung wie bei α) titriert.

γ) Mikroverfahren. W. PONNDORF hat außer den vorstehenden Methoden noch 2 Mikroverfahren zur Bestimmung von 0,1–0,4 mg bzw. 0,001–0,08 mg Acetaldehyd unter Verwendung von kolloidalem Silberoxyd beschrieben, auf die hier lediglich verwiesen sei.

## II. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Aldehyde.

### 1. Formaldehyd.

Formaldehyd,  $H \cdot CHO$ , ist ein stechend riechendes Gas. Das verflüssigte Gas siedet bei  $-21^{\circ}$  und hat bei  $-20^{\circ}$  das Spez. Gew. 0,8153. In Wasser ist Formaldehyd bis zu etwa 40 Gew.-% leicht löslich.

Beim Konzentrieren von Formaldehydlösungen scheidet sich Paraformaldehyd,  $(H \cdot CHO)_n$ , als amorpher Stoff ab. Es ist ein weißes, nach Formaldehyd riechendes Pulver, welches sich sehr wenig in Wasser, Alkohol und Äther löst, dagegen in Alkalilaugen,

<sup>1</sup> Die Silbernitratlösung wird nach der Feintitration nach PONNDORF (Zeitschr. analyt. Chem. 1931, 85, 8) eingestellt. Man verfährt dazu folgendermaßen: Zur Herstellung der Titrationsbasis gibt man zu 20 ccm Wasser 2,0 ccm etwa 0,002 N.-Jod-Kaliumjodidlösung, 2 ccm frisch bereitete 1%ige Stärkelösung und 1 Tropfen verd. Schwefelsäure (1:5). Man titriert mit 0,002 N.-Silbernitratlösung auf Gelb. Die Basis enthält Jod ohne Jodwasserstoffsäure. — In einen 500 ccm-ERLENMEYER-Kolben gibt man 50 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung + 50 ccm Wasser + 5 ccm 20%ige Schwefelsäure (chlor- und sulfittfrei) und läßt 50 ccm 0,1 N.-Kaliumjodidlösung zufließen. Danach oder kurz vor dem Umschlagspunkt wird die Titrationsbasis zugegeben. Darauf gibt man noch einen Überschuß von 10 ccm 0,01 N.-Kaliumjodidlösung über den Umschlagspunkt hinaus zu und titriert mit 0,01 N.-Silbernitratlösung zurück, bis die Farbe des Silberjodids in reines Gelb übergeht.

Ammoniaklösungen sowie in warmen verd. Säuren löslich ist. Lufttrocknes Paraformaldehyd sintert bei etwa 150° und ist klar geschmolzen bei 160—162°. Feuchte Präparate schmelzen schon bei 100°<sup>1</sup>.

Formaldehyd geht durch verdünnte Natronlauge in Ameisensäure und Methylalkohol über und wird durch alkalische Jodlösung zu Ameisensäure oxydiert.

Die Reaktionen werden meist mit dem durch Wasserdampfdestillation gewonnenen Destillat angestellt.

#### Handelswaren des Formaldehyds.

Die Handelswaren enthalten 30—40 Gew.-% Formaldehyd. Da solche reinen Lösungen sich infolge Polymerisation bei niedriger Temperatur leicht trüben, werden ihnen vielfach 7—15% Methylalkohol<sup>2</sup> zugesetzt. Als Begleitkörper enthält Formaldehyd ferner auch geringe Mengen Ameisensäure. Das Spez. Gewicht ( $d_{40}^{18}$ ) des reinen 30—40 gew.-%igen Formaldehyds beträgt nach F. AUERBACH u. H. BARSCHALL<sup>3</sup> 1,092—1,124.

Das Deutsche Arzneibuch VI stellt folgende Anforderung an Formaldehydlösung: Gehalt mindestens 35% Formaldehyd (HCHO, Mol.-Gew. 30,02).

Klare, farblose, stechend riechende, wäßrige Flüssigkeit, die wechselnde Mengen Methylalkohol enthält und Lackmuspapier höchstens schwach rötet. Formaldehydlösung mischt sich mit Wasser oder Weingeist in jedem Verhältnis, nicht aber mit Äther. — Dichte 1,075 bis 1,086.

Formaldehydlösung hinterläßt beim Eindampfen auf dem Wasserbad eine weiße, amorphe, in Wasser nicht sofort lösliche Masse.

Wird Formaldehydlösung mit Ammoniakflüssigkeit stark alkalisch gemacht und hierauf auf dem Wasserbad eingedampft, so verbleibt ein weißer, kristallinischer, in Wasser sehr leicht löslicher Rückstand. Formaldehydlösung scheidet aus ammoniakalischer Silberlösung allmählich metallisches Silber ab. Alkalische Kupferaratrlösung wird beim Erhitzen mit Formaldehydlösung unter Abscheidung eines roten Niederschlags entfärbt.

Die mit 4 Tln. Wasser verdünnte Formaldehydlösung darf weder durch Silbernitratlösung (Salzsäure), noch durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure), noch nach Zusatz von 3 Tropfen verd. Essigsäure durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Schwermetallsalze) verändert werden. 1 ccm Formaldehydlösung darf nach Zusatz von 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung zur Neutralisation höchstens 0,05 ccm N.-Kalilauge verbrauchen (unzulässige Menge Säure).

Die beim Eindampfen von 10 g Formaldehydlösung hinterbleibende weiße Masse darf nach dem Verbrennen höchstens 0,001 g Rückstand hinterlassen.

Gehaltsbestimmung. Etwa 1 g Formaldehydlösung wird in einem Meßkölbchen von 100 ccm Inhalt, das 2,5 ccm Wasser und 2,5 ccm N.-Kalilauge enthält, genau gewogen; das Kölbchen wird nach dem Umschütteln mit Wasser bis zur Marke gefüllt. 10 ccm dieser Lösung versetzt man mit 50 ccm 0,1 N.-Jodlösung und fügt 20 ccm N.-Kalilauge hinzu. Man läßt  $\frac{1}{4}$  Stunde lang bei Zimmertemperatur stehen und fügt dann 10 ccm verd. Schwefelsäure zu. Hierbei müssen für je 0,1 g Formaldehydlösung mindestens 23,3 ccm 0,1 N.-Jodlösung verbraucht werden, so daß zur Bindung des überschüssigen Jodes höchstens 26,7 ccm 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung erforderlich sind, was einem Mindestgehalte von 35% Formaldehyd entspricht (1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,001501 g Formaldehyd, Stärkelösung als Indicator).

#### a) Nachweis von Formaldehyd.

Soweit in einer Lösung oder in einem Wasserdampfdestillat außer Formaldehyd keine anderen Aldehyde vorliegen, kann der Formaldehyd durch die allgemeinen Aldehydreaktionen (S. 1023) nachgewiesen werden.

Die nachfolgenden Reaktionen sind für Formaldehyd eindeutig.

<sup>1</sup> Das Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch stellt an Paraformaldehyd bestimmte Anforderungen, auf die hier verwiesen sei. Die Gehaltsbestimmung entspricht der des Deutschen Arzneibuches VI an Formaldehydlösung.

<sup>2</sup> Über die Bestimmung des Methylalkohols im Formaldehyd vgl. J. KÖNIG: Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe, 5. Aufl., Bd. 2, S. 366. Berlin: Paul Parey 1926.

<sup>3</sup> F. AUERBACH u. H. BARSCHALL: Arb. kaiserl. Gesundheitsamt 1905, 22, 11.

### a) Überführung in Hexamethylentetramin nach ROMJN<sup>1</sup>.

Die auf Formaldehyd zu prüfende Flüssigkeit, gegebenenfalls ihr Wasserdampfdestillat, wird mit Ammoniak im Überschuß versetzt und in der Weise unter zeitweiligem Zusatz geringer Mengen Ammoniak zur Trockne verdampft, daß die Flüssigkeit immer alkalisch bleibt. Bei Gegenwart nicht zu geringer Mengen Formaldehyd hinterbleiben charakteristische Krystalle von Hexamethylentetramin (S. 1043). Der Rückstand wird in etwa 4 Tropfen Wasser gelöst, von der Lösung wird je 1 Tropfen auf einen Objektträger gebracht und mit den beiden folgenden Reagenzien geprüft:

1. mit 1 Tropfen gesättigter Quecksilberchloridlösung. Es entsteht sofort oder nach kurzer Zeit ein regulärer krystallinischer Niederschlag von drei- oder mehrstrahligen Sternen, später entstehen Oktaeder.

2. mit 1 Tropfen einer Kalium-Quecksilberjodidlösung und einer sehr geringen Menge verd. Salzsäure. Es bilden sich hexagonale hellgelbe Sterne.

Die Kalium-Quecksilberchloridlösung wird in der Weise hergestellt, daß man zu einer 10%igen Kaliumjodidlösung unter Erwärmen und Umrühren solange Quecksilberjodid zusetzt, bis ein Teil davon ungelöst bleibt; die Lösung wird nach dem Erkalten filtriert.

**Mikrochemische Ausführung**<sup>2</sup>. Man setzt zu der zu prüfenden Lösung bzw. dem Destillat einen Überschuß von Ammoniak hinzu und erwärmt bis zum Austreiben des Überschusses. Hiernach wird bis zum Entstehen einer Randkruste konzentriert und durch Zusatz von Kaliumferrocyanid und ein wenig Salzsäure die Ferrocyanverbindung der tertiären Base gefällt. Diese bildet rhomboide und 6eckige Täfelchen (500  $\mu$ ) des monoklinen Systems. Auslöschung der Rhomboide diagonal, der Sechsecke nach Orthodoma. Lebhaft polarisationsfarben. Mit viel Salzsäure entstehen weit größere Rauten eines sauren Salzes. Als charakteristisch können auch die Kondensationsprodukte mit Carbamid und Urethan gelten, beide nur aus konzentrierten Lösungen unter Wirkung rauchender Salzsäure zu erhalten. Mit Carbamid entstehen farblose rhomboidische Täfelchen, schwach polarisierend, meist zu kleinen Rosetten (80—100  $\mu$ ) verwachsen; mit Urethan stabförmige, schwach polarisierende Krystallchen in der Regel X-förmig gekreuzt.

### $\beta$ ) Farbenreaktionen<sup>3</sup>.

Von den zahlreichen für den Nachweis von Formaldehyd vorgeschlagenen Farbenreaktionen sind nach den kritischen Untersuchungen von TH. SABALITSCHKA und C. HARNISCH<sup>3</sup> eindeutig:

noch in Konzentrationen 1:50000: Die Phloroglucin-Reaktion nach JUDD und SABALITSCHKA-RIESENBERG, die Resorcin-Reaktion nach R. COHN, die Reaktion mit Phenylhydrazin und Nitroprussidnatrium nach C. ARNOLD und C. MENTZEL, RIMINI und die Reaktion mit Fuchsin-Schwefliger Säure nach H. FINCKE;

in höheren Konzentrationen: Die Phloroglucin-Reaktion nach K. WEBER und B. TOLLENS, die Apomorphin-Reaktion nach B. PFYLG. REIF-A. HANNER, die Naphthol-Reaktion nach DANÉ und die Naphthalin-Reaktion nach DITZ.

1. Phloroglucin-Reaktion<sup>4</sup>. Nach TH. SABALITSCHKA und H. RIESENFELD<sup>5</sup> verfährt man, wie folgt: 2 ccm 0,1%ige Phloroglucinlösung werden mit 1 ccm 10%iger Kalilauge vermischt. Zu dieser immer frisch zu bereitenden Lösung gibt man 2 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit, schüttelt gut durch und beobachtet, ob eine Färbung eintritt. Je nach der Konzentration des Formaldehyds ist die Färbung tiefrot bis schwach rosa.

<sup>1</sup> ROMJN: Pharm. Ztg. 1895, 40, 407.

<sup>2</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse S. 67. 1922.

<sup>3</sup> Eine Zusammenstellung und kritische Prüfung der wichtigsten einschlägigen Farbenreaktionen für Formaldehyd bringen LILLIG: Pharm. Ztg. 1919, 64, 415 u. TH. SABALITSCHKA u. C. HARNISCH: Pharm. Zentralh. 1926, 67, 289.

<sup>4</sup> Phloroglucin verwendeten auch PRESCOTT und NIERENSTEIN zum Formaldehydnachweis; vgl. Fußnote 5.

<sup>5</sup> Nach TH. SABALITSCHKA u. C. HARNISCH: Pharm. Zentralh. 1926, 67, 289.

Die Färbung ist nicht beständig, sondern verschwindet um so rascher, je weniger Formaldehyd vorhanden ist. Die rote Färbung geht allmählich in eine gelbliche, dann in eine bläuviolette über. Auch bei Abwesenheit von Formaldehyd stellt sich allmählich die bläuviolette Färbung ein; charakteristisch für Formaldehyd ist also nur die rote Färbung, die 12 Minuten anhält. Starke Formaldehydlösungen (10—30%) geben mit diesem Reagens keine oder nur eine äußerst schwache Färbung; erst bei einer 3%igen Lösung tritt die rote Farbe auf, die bei 1% am stärksten ist. Empfindlichkeit 1 : 900000.

Nach JUDD<sup>1</sup> versetzt man 10 ccm der zu prüfenden Lösung mit 10 ccm 5%iger Natronlauge, die 1—2 Tropfen alkoholische Phloroglucinlösung enthält. Bei Anwesenheit von Formaldehyd tritt eine rosarote Färbung der Mischung ein, die 12 Minuten lang anhält. Empfindlichkeit 1 : 100000.

Butylaldehyd gibt nur eine 4 Minuten, Acetaldehyd eine 6—8 Minuten lang anhaltende Rotfärbung. Nach dem Verschwinden der Rotfärbung tritt eine gelbbraune Farbe auf. Auch Furfurol gibt nach C. NEUBERG<sup>2</sup> eine ähnliche Reaktion, die aber nach TH. SABALITSCHKA und C. HARNISCH<sup>3</sup> stets später eintritt und der Formaldehydreaktion nur in der ersten halben Minute ähnlich ist; während die Rosafärbung bei der Formaldehydreaktion allmählich blasser wird und schließlich in Bläuviolett übergeht, wird das Rosa bei Furfurol immer stärker und geht schließlich in ein Weinrot über.

K. WEBER und B. TOLLENS<sup>4</sup> führen die Phloroglucin-Reaktion in salzsaurer Lösung aus, während D. SCHENK und H. BURMEISTER<sup>5</sup> mit konz. Schwefelsäure unterschichten. Diese Reaktionen in saurer Lösung sind aber wesentlich weniger empfindlich als die in alkalischer Lösung.

2. Resorcin-Reaktion nach R. COHN<sup>6</sup>. Zu 2 ccm einer frisch bereiteten 0,1%igen Resorcinlösung setzt man 2 ccm der zu untersuchenden Lösung, schüttelt gut durch und unterschichtet die Mischung mit etwa 2 ccm konz. Schwefelsäure. Bei Anwesenheit von Formaldehyd tritt je nach der Konzentration der Lösung ein kräftiger weinroter bis zart rosafarbiger Ring mit einer darüber liegenden starken bis schwachen Ausflockung auf. Nur beim Auftreten dieses Ringes ist die Reaktion als positiv anzusehen. Ein bräunlicher Ring tritt oft bei nicht ganz reinem Resorcin von selbst ein. Empfindlichkeit 1 : 100000.

3. Phenylhydrazin-Reaktion nach E. RIMINI. E. RIMINI<sup>7</sup> verfährt, wie folgt: 15 ccm der auf Formaldehyd zu prüfenden Lösung, deren Formaldehydgehalt gering sein muß, werden mit 1 ccm einer wäßrigen 4%igen Lösung von Phenylhydrazinchlorhydrat und mit 3—4 Tropfen frisch bereiteter 0,5%iger Natriumnitroprussidlösung versetzt; darauf wird mit einigen Tropfen konz. Natronlauge stark alkalisch gemacht. Die Mischung soll sich blau und nach einiger Zeit rot färben, falls Formaldehyd vorhanden ist. Charakteristisch ist die Blaufärbung, da die Rotfärbung auch ohne Formaldehyd nach einiger Zeit von selbst eintritt. Empfindlichkeit 1 : 1000000. Acetaldehyd, Par-, Isobutyl-, Valerian-, Benz-, Zimt- und Salicylaldehyd, ferner Furfurol, Aceton, Methylalkohol, Ameisen- und Salicylsäure geben nach RIMINI die Reaktion nicht.

RIMINI hat auch eine weitere Ausführungsform der Phenylhydrazin-Reaktion angegeben, bei der statt der Natriumnitroprussidlösung 1 ccm 4%iger Eisenchloridlösung angewendet und mit Salzsäure angesäuert wird. Diese Reaktion bietet keine Vorteile und ist weniger empfindlich.

C. ARNOLD und C. MENTZEL<sup>8</sup> lösen in 5 ccm der zu prüfenden kalten Flüssigkeit ein erbsengroßes Stückchen Phenylhydrazinchlorhydrat, geben dazu 2—4 Tropfen einer 5 bis 10%igen Natriumnitroprussidlösung und etwa 10 Tropfen einer 10—15%igen Natronlauge. Bei Anwesenheit von Formaldehyd entsteht sofort eine blaue bis blaugraue Färbung. Empfindlichkeit 1 : 60000. Die Empfindlichkeit der Reaktion wird erhöht, wenn man statt Nitroprussidnatrium Ferricyankalium verwendet. Die dabei entstehende scharlachrote Färbung hält sich tagelang.

Es ist noch eine Reihe weiterer Ausführungsformen der Phenylhydrazin-Reaktion beschrieben worden, wegen derer auf die Arbeit von TH. SABALITSCHKA und C. HARNISCH (S. 1037) verwiesen sei.

<sup>1</sup> JUDD: Amer. Journ. Pharm. 1904, **76**, 389; nach TH. SABALITSCHKA u. C. HARNISCH.

<sup>2</sup> C. NEUBERG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, **32**, 1962.

<sup>3</sup> TH. SABALITSCHKA u. C. HARNISCH: Pharm. Zentralh. 1926, **67**, 289.

<sup>4</sup> K. WEBER u. B. TOLLENS: Ann. Chem. 1898, **299**, 317; Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 2511. — C. H. A. CLOWES u. B. TOLLENS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, **32**, 2841. — Vgl. auch C. COUNCLER: Chem.-Ztg. 1896, **20**, 599 u. E. C. CROCKER: Ind. Engin. Chem. 1925, **17**, 1158; C. 1926, I, 1461.

<sup>5</sup> D. SCHENK u. H. BURMEISTER: Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 1921, **31**, 423 u. Chem.-Ztg. 1921, **45**, 997.

<sup>6</sup> R. COHN: Chem.-Ztg. 1921, **45**, 997.

<sup>7</sup> E. RIMINI: Ann. di Farmacol. 1898, **3**, 97; Z. 1898, **1**, 858.

<sup>8</sup> C. ARNOLD u. C. MENTZEL: Chem.-Ztg. 1902, **26**, 246; Pharm. Zentralh. 1902, **43**, 284.

4. Fuchsinbisulfit-Reaktion nach H. FINCKE<sup>1</sup>. Zum eindeutigen Nachweis von Formaldehyd darf nicht das SCHIFFSCHE Reagens verwendet werden, welches mit allen Aldehyden reagiert (S. 1030), sondern es muß nach der Vorschrift von H. GROSSE-BOHLE (S. 992) hergestellt werden, welches sich durch einen höheren Gehalt an freier Säure von dem SCHIFFSCHEM Reagens unterscheidet.

10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit werden mit 1—2 ccm 25%iger Salzsäure versetzt und 1 ccm Fuchsinbisulfitlösung hinzugefügt. Beim Vorhandensein von Formaldehyd tritt je nach dessen Menge in einigen Minuten bis spätestens 12 Stunden eine haltbare blaubis rotviolette Färbung ein. Zum Gelingen der Reaktion ist genaues Einhalten der Vorschrift erforderlich. Die Empfindlichkeit der Formaldehyd-Reaktion beträgt nach TH. SABALITSCHKA und C. HARNISCH 1:100000 und nach FINCKE 1:500000.

Bei Acetaldehyd nimmt in genügend verdünnten Lösungen die Färbung ziemlich rasch ab, während die Färbung mit Formaldehyd mit der Zeit an Stärke zunimmt und sehr beständig ist. Der Unterschied ist am größten in stark saurer Lösung. Furfurol stört nach TH. SABALITSCHKA und C. HARNISCH die Reaktion nicht.

5. Apomorphin-Reaktion nach B. PFYL, G. REIF und A. HANNER<sup>2</sup>. Vgl. den Methylalkohol-Nachweis S. 993. Die Reaktion ist mit Apomorphin für Formaldehyd eindeutig. Es entsteht eine dunkelgrauviolette Färbung. Empfindlichkeit 1:5000—6000.

H. LÜHRIG<sup>3</sup> hält die Reaktion für empfehlenswert, aber für nicht empfindlich genug.

Furfurol gibt mit Apomorphin eine längere Zeit haltbare Rotfärbung, die später in Blau übergeht.

6. Tryptophan-Reaktion nach O. HEHNER. Die Reaktion ist in der von O. HEHNER bzw. in der von N. LEONARD und H. M. SMITH abgeänderten Form (S. 1030) für Formaldehyd eindeutig. Vgl. auch F. v. FILLINGER<sup>4</sup>.

7. Sonstige Reaktionen sind die  $\alpha$ -Naphthol-Reaktion nach DANÉ<sup>5</sup>, die Naphthalin-Reaktion nach DITZ<sup>6</sup> und die für den Nachweis von Methylalkohol vorgeschlagenen Methoden (S. 991), welche auf dessen Oxydation zu Formaldehyd beruhen.

## b) Bestimmung des Formaldehyds.

Von den vielen zur Bestimmung des Formaldehyds vorgeschlagenen Verfahren — ihre Zahl beläuft sich auf etwa 40 — haben vorwiegend das Ammoniumchlorid-, das Wasserstoffsperoxyd-, das Sulfit-, das mercurimetrische und das Jod-Verfahren Eingang in die Praxis gefunden, und dazu kommt als neueres das Methon- (Dimedon-) Verfahren. Für Lösungen, welche neben Formaldehyd andere Aldehyde und Aceton enthalten, eignet sich besonders das Cyankalium-Verfahren. Nach den kritischen Versuchen von F. MACH und R. HERRMANN<sup>7</sup> und J. BÜCHI<sup>8</sup> geben diese Verfahren gut übereinstimmende Werte, nur die des Ammoniumchlorid-Verfahrens liegen bis zu 1% niedriger. Das Sulfit-Verfahren ist jedoch allen anderen vorzuziehen, da es rasch und sicher ausführbar ist und auch durch die Anwesenheit von Äthylalkohol nicht beeinflußt wird.

### $\alpha$ ) Ammoniumchlorid-Verfahren.

Sein Prinzip stimmt mit dem des Ammoniakverfahrens von LEGLER<sup>9</sup> überein. Nach J. BÜCHI<sup>8</sup> werden etwa 6 g Formaldehydlösung in einem 100 ccm-Meßkölbchen mit Wasser bis zur Marke verdünnt. 25 ccm dieser Lösung (= 1,5 g Formaldehydlösung) werden in einem ERLLENMEYER-Kolben mit Glasstopfen mit 3 Tropfen Bromthymolblau (0,1%) versetzt und bis zum Farbumschlag in Blau

<sup>1</sup> H. FINCKE: Biochem. Zeitschr. 1913, 51, 260; 52, 214; Z. 1914, 27, 246.

<sup>2</sup> B. PFYL, G. REIF u. A. HANNER: Chem.-Ztg. 1921, 45, 1220; Z. 1921, 42, 218; Pharm. Zentralh. 1922, 63, 193.

<sup>3</sup> H. LÜHRIG: Pharm. Zentralh. 1922, 63, 597.

<sup>4</sup> F. v. FILLINGER: Z. 1908, 16, 226.

<sup>5</sup> DANÉ: L'Union pharmaceutique 1909, 1.

<sup>6</sup> DITZ: Chem.-Ztg. 1907, 31, 445.

<sup>7</sup> F. MACH u. R. HERRMANN: Zeitschr. analyt. Chem. 1923, 62, 104.

<sup>8</sup> J. BÜCHI: Pharmac. Acta Helv. 1931, 6, 1—54. In dieser Arbeit ist eine ausführliche Übersicht und Kritik der Formaldehydbestimmungsmethoden gegeben.

<sup>9</sup> LEGLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1883, 16, 1333.

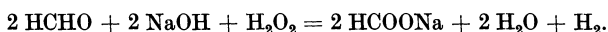


neutralisiert. Hierauf werden der Lösung 1,5 g neutrales Ammoniumchlorid und rasch 25 ccm N.-Lauge zugesetzt, der Kolben gut verschlossen (Vaselin-dichtung) und während 1—1½ Stunden stehen gelassen. Hierauf wird das überschüssige Ammoniak mit N.-Salzsäure bis zum Farbumschlag in Grün zurücktitriert. 1 ccm N.-Natronlauge entspricht 0,04503 g Formaldehyd.

Reiner Äthylalkohol ist in 0,50—0,001 molarer Konzentration ohne Einfluß auf das Formaldehyd-Ergebnis. In Konzentrationen über 0,5% (0,01 molar) übt reiner Acetaldehyd einen bedeutend resultaterhöhenden Einfluß aus. Aceton in 0,50—0,001 molarer Konzentration übt keine Beeinflussung aus.

### β) Wasserstoffsperoxyd-Verfahren.

Die Methode beruht auf der Oxydation des Formaldehyds zu Ameisensäure durch Wasserstoffsperoxyd in Gegenwart titrierter Lauge nach BLANK und FINKENBEINER<sup>1</sup>:



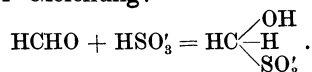
Durch Zurücktitrieren der zur Formiatbildung nicht verbrauchten Natronlauge läßt sich der Gehalt an Formaldehyd berechnen.

Nach J. BÜCHI werden etwa 6 g Formaldehydlösung in einem 100 ccm-Meßkölbchen mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. 25 ccm dieser Lösung (= 1,5 g Formaldehydlösung) werden in einem ERLÉNMEYER-Kolben mit dem zur Titration in Aussicht genommenen Indicator (Phenolphthalein, Thymolblau oder Bromthymolblau) versetzt und, wenn nötig, mit N.-Natronlauge neutralisiert. Hierauf werden rasch nacheinander 25 ccm N.-Natronlauge und 25 ccm 3%ige Wasserstoffsperoxydlösung hinzugefügt. Dann wird 15 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt und nach dem Aufsetzen eines Natronkalkrohres erkalten gelassen. Die überschüssige Natronlauge wird hierauf mit N.-Salzsäure zurücktitriert. 1 ccm N.-Natronlauge = 0,03002 g Formaldehyd.

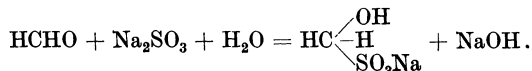
Die Beeinflussung durch Äthylalkohol bewegt sich innerhalb der Fehlergrenzen. Acetaldehyd wirkt in 0,5—0,001 molarer Konzentration stark resultaterhöhend. Zu hohe Resultate werden bei Konzentrationen über 0,5% erhalten. Eine praktisch nicht zu vernachlässigende Beeinflussung tritt bei größeren Acetommengen auf; bei 0,50 molarer Lösung beträgt sie 0,04%.

### γ) Natriumsulfit-Verfahren.

Formaldehyd reagiert mit dem Bisulfiten in jeder Verdünnung praktisch quantitativ nach folgender Gleichung:



Wird eine Natriumbisulfitlösung mit Formaldehyd gemischt, so bildet sich Formaldehyd-Schweflige Säure. Da Natriumsulfit in wäßriger Lösung gespalten ist, kann es ebenfalls in der oben angeführten Weise reagieren und setzt sich, wie folgt, um:



Die bei dieser Umsetzung entstehende Natronlauge ist äquivalent der zur Reaktion gebrachten Menge Formaldehyd. Durch Titration der gebildeten Lauge mit Säure kann der Formaldehyd-Gehalt indirekt bestimmt werden. Auf Grund der Untersuchungen von K. TÄUFEL und WAGNER<sup>2</sup>, deren Verfahren die einfachste und rascheste Bestimmung des Formaldehyds gestattet, läßt sich folgende Vorschrift aufstellen:

<sup>1</sup> BLANK u. FINKENBEINER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1898, **31**, 2979.

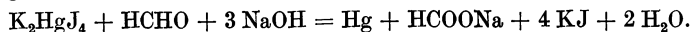
<sup>2</sup> K. TÄUFEL u. WAGNER: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, **68**, 25.

Etwa 6 g Formaldehydlösung (genau gewogen) werden in einem 100 ccm-Meßkölbchen mit Wasser bis zur Marke verdünnt. 25 ccm dieser Lösung werden mit 3 Tropfen Thymolphthalein (0,1%) versetzt und mit N.-Natronlauge bis zur eben eintretenden Blaufärbung neutralisiert. Hierauf gibt man zu diesem Gemisch eine thymolphthalein-neutrale Lösung von 6,5 g krystallisiertem Natriumsulfit in 25 ccm Wasser und titriert langsam mit N.-Salzsäure bis zur vollständigen Entfärbung. 1 ccm N.-Salzsäure = 0,03002 g Formaldehyd.

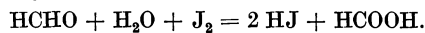
Reiner Äthylalkohol übt keinen Einfluß auf das Formaldehydresultat aus. In Konzentrationen, die 0,5% überschreiten, wirkt Acetaldehyd stark resultaterhöhend. Aceton wirkt erst bei Konzentrationen über 7% auf das Formaldehydresultat ein.

#### d) Mercurimetrisches Verfahren.

Quecksilberchlorid wird in überschüssigem Kaliumjodid zu Kaliumquecksilberjodid gelöst, dessen alkalische Lösung mit dem NESSLERSchen Reagens identisch ist. Setzt man zu dieser komplexen Quecksilberjodidlösung Formaldehyd und Natronlauge, so tritt augenblicklich Reduktion zu metallischem Quecksilber ein.



Sofern Formaldehyd im Überschuß vorhanden ist (Sublimat-Bestimmung), wird die Quecksilbersalz-Verbindung quantitativ zu Quecksilber reduziert. Ist hingegen die komplexe Quecksilberverbindung im Überschuß vorhanden, so fällt eine dem vorhandenen Formaldehyd äquivalente Menge Quecksilber aus (Formaldehyd-Bestimmung). Das Reduktionsprodukt kann in beiden Fällen jodometrisch bestimmt werden. Jodjodkalium (volumetrische Jodlösung) löst nach dem Ansäuern mit Essigsäure das metallische Quecksilber auf unter Bildung von Kaliumquecksilberjodid. Der hierzu in Anwendung gebrachte Jodüberschuß wird mit Natriumthiosulfat zurückgemessen. Der so ermittelte Jodverbrauch dient als Maß für das reduzierte Quecksilber. Das komplexe Quecksilbersalz dient eigentlich nur als Vermittler und alles vollzieht sich, wie wenn das Jod direkt den Aldehyd oxydierte:



Nach J. BÜCHI werden etwa 1,75 g Formaldehyd-Lösung in einem 500 ccm-Meßkolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. 25 ccm dieser Lösung gibt man in einen 200 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit Glasstopfen zu einer Lösung von 1 g Quecksilberchlorid + 2,5 g Kaliumjodid in 35 ccm Wasser und fügt unter ständigem Umschwenken 20 ccm 2 N.-Natronlauge hinzu. Das Gemisch läßt man unter häufigem Schütteln 5 Minuten lang stehen, säuert mit 25 ccm 2 N.-Essigsäure an und gibt sofort 25 ccm 0,1 N.-Jodlösung hinzu. Hierauf schüttelt man bis zur völligen Lösung des Niederschlages und titriert das überschüssige Jod unter Verwendung von Stärkelösung als Indicator zurück. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,001501 g Formaldehyd.

Reiner Äthylalkohol und Aceton sind ohne Einfluß. Bei mehr als 0,5% Acetaldehyd ist die Methode unbrauchbar, da sie dann zu hohe Werte liefert.

#### e) Jod-Verfahren.

Dieses von G. ROMJN<sup>1</sup> stammende Verfahren beruht auf der Oxydation des Formaldehyds durch Hypojodit zu Ameisensäure.

Das beim Einbringen von Jod in Kalilauge intermediär gebildete Kaliumhypoiodit reagiert mit Formaldehyd nach der Gleichung  $\text{KJO} + \text{KOH} + \text{HCHO} = \text{KJ} + \text{H}_2\text{O} + \text{HCOOK}$ . Der Überschuß an Hypojodit wird in Kaliumjodid und -jodat übergeführt und das durch Zusatz von Schwefelsäure freigemachte Jod mit Thiosulfatlösung zurückgemessen. Da nach der Gleichung  $6 \text{KOH} + 6 \text{J} = 3 \text{KJ} + 3 \text{KJO} + 3 \text{H}_2\text{O}$  zur Bildung

<sup>1</sup> G. ROMJN: Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 18.

von 3 KJO 6 Atome J erforderlich sind und da 3 KJO 3 Mol HCHO entsprechen, so ist 1 Mol HCHO 2 J äquivalent.

Nach J. BÜCHI werden etwa 2,5 g Formaldehydlösung mit Wasser auf 500 ccm verdünnt und von dieser Lösung 25 ccm mit 50 ccm 0,1 N.-Jodlösung versetzt; unmittelbar darauf werden 8 ccm verd. Natronlauge zugegeben und dann wird 10 Minuten beiseite gestellt. Hierauf fügt man 8 ccm verd. Salzsäure hinzu und titriert das überschüssige Jod mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurück. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,001501 g Formaldehyd.

Bei einem Gehalt von über 0,25% Äthylalkohol macht sich eine Resultaterhöhung bemerkbar. Ist mehr als 1% Äthylalkohol vorhanden, so gibt sich die Verunreinigung durch Jodoformgeruch zu erkennen. Die geringste Menge Acetaldehyd (0,2%) vermag das Resultat merklich zu erhöhen, wobei auch ein deutlicher Geruch nach Jodoform auftritt. Bei über 5% Acetaldehyd tritt Jodoformfällung ein. Ungefähr in gleich starker Weise wie Acetaldehyd wirkt sich Aceton aus.

### ζ) Methon- (Dimethon-) Verfahren.

Das von D. VORLÄNDER<sup>1</sup> entdeckte Methon (= 5,5-Dimethyl-dihydro-resorcin) ist zur Bestimmung des Formaldehyds besonders geeignet, weil es mit diesem das gut zu isolierende Kondensationsprodukt Methylen-bis-dimethyl-dihydro-resorcin (Methylen-dimethon) liefert (S. 1027).

Nach M. V. JONESCU und C. BODEA<sup>2</sup> versetzt man die kalte wäßrige neutrale und verdünnte Lösung (höchste Menge = 0,3 g Formaldehyd) mit überschüssiger 5–10%iger Methonlösung und läßt bei Zimmertemperatur unter öfterem Rühren 6 Stunden stehen; oder man kocht sofort 10 Minuten und läßt 30 Minuten stehen. Dann filtriert man den krystallinen Niederschlag (*a*) durch einen Gooch-Tiegel, wäscht mit kaltem Wasser und trocknet bei 110–115°.  $a \times 0,10274$  = Formaldehyd. Mittlerer Fehler =  $\pm 0,07\%$ . — Für geringe Konzentrationen (bis 2%) hängt die Reaktionsdauer nicht von der Formaldehydkonzentration, sondern von der Temperatur ab. Die Kochdauer darf aber 15 Minuten nicht überschreiten, weil Methylen-dimethon durch siedendes Wasser langsam zersetzt wird. Nach dem Kochen muß man unbedingt auf Zimmertemperatur abkühlen lassen, weil eine kleine Menge der Verbindung in der Hitze in die Komponenten zurückgespalten wird.

Das Verfahren ist schneller, bequemer und genauer als das von D. VORLÄNDER<sup>3</sup> angegebene. Bei Gegenwart von Acetaldehyd und anderen Aldehyden ist das Verfahren nicht anwendbar.

### η) Kaliumcyanid-Verfahren.

Dieses von G. ROMIJN<sup>4</sup> herrührende Verfahren kann zur Bestimmung des Formaldehyds neben Acetaldehyd, Benzaldehyd und Aceton angewendet werden. Das Verfahren beruht darauf, daß sich Formaldehyd mit Kaliumcyanid zu Oxy-acetonitrilkalium vereinigt.

Die zu untersuchende Lösung wird in einem 50 ccm-Kolben mit 10 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung, 2 Tropfen 50%iger Salpetersäure und 10 ccm 0,62%iger Kaliumcyanidlösung versetzt und auf 50 ccm aufgefüllt. Nach dem Umschütteln wird die Lösung durch ein trockenes Filter filtriert und 25 ccm des Filtrates werden mit Rhodanammoniumlösung nach VOLHARD titriert.

<sup>1</sup> D. VORLÄNDER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 1801; Liebigs Ann. 1897, **294**, 252; **300**, 370.

<sup>2</sup> M. V. JONESCU u. C. BODEA: Bull. Soc. chim. France 1930, [4] **47**, 1408; C. 1931, I, 1487.

<sup>3</sup> D. VORLÄNDER: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **77**, 241 u. 321.

<sup>4</sup> G. ROMIJN: Zeitschr. analyt. Chem. 1897, **36**, 18.

FR. LIPPICH<sup>1</sup> säuert bei seinen „Nitrilverfahren“ die mit einem gemessenen Überschuß von Kaliumcyanid versetzte Lösung nach 4—5 Minuten mit Weinsäure an und destilliert die überschüssige Blausäure ab. Bei der Destillation wird durch ein eingeschmolzenes Gaseinleitungsrohr kohlenstofffreie Luft durch den mit einem eingeschmolzenen Rückflußkühler versehenen 500 ccm-Kolben gesaugt. Das obere, rechtwinklig umgebogene Kühlerrohr steht mit 2 Absorptionswaschflaschen mit 10%iger Kalilauge in Verbindung, in welchen die Blausäure gebunden wird. Die Blausäure wird unter Zusatz von Kaliumjodid und Ammoniak nach LIEBIG mit Silbernitratlösung titriert.

### 9) Colorimetrische Verfahren.

Für die colorimetrische Bestimmung sehr kleiner Formaldehydmengen sind empfohlen worden die Reaktion mit Phloroglucin von K. WEBER und B. TOLLENS<sup>2</sup>, ferner von R. J. COLLINS und P. J. HANZLIK<sup>3</sup>, sowie von M. BRUGGER<sup>4</sup>.

Nach dem Verfahren von M. BRUGGER, welches noch die Bestimmung von 0,125 mg Formaldehyd gestattet, werden 10 ccm der zu untersuchenden Lösung in einem Reagensglase mit genau 1 ccm Phloroglucinreagens (hergestellt durch Lösen von 0,1 g Phloroglucin in 10 ccm 10%iger Natronlauge; vor Licht geschützt aufzubewahren) versetzt, umgeschüttelt und bei höchster Farbintensität — 2 Minuten nach dem Reagenszusatz — im Colorimeter von AUTENRIETH auf gleiche Farbstärke mit Vergleichslösungen von bekanntem Formaldehydgehalt eingestellt.

Auch die Reaktion mit Fuchsinbisulfitlösung nach H. FINCKE<sup>5</sup> ist zur colorimetrischen Bestimmung von Formaldehyd empfohlen worden.

### i) Sonstige Verfahren.

An sonstigen Verfahren zur Bestimmung des Formaldehyds sind unter anderen noch empfohlen worden ein refraktometrisches Verfahren mit dem Zeisschen Eintauchrefraktometer<sup>6</sup>, ein elektrometrisches von E. MÜLLER und W. LÖW<sup>7</sup> und die gasometrischen von E. RIEGLER<sup>8</sup>, von G. B. FRANKFORTER und R. WEST<sup>9</sup>, sowie von E. RIMINI und T. JONA<sup>10</sup>; ferner wurde von LEGLER<sup>11</sup> die Bestimmung als Hexamethylentetramin empfohlen.

## Hexamethylentetramin.

Hexamethylentetramin (Urotropin, Formin),  $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ , entsteht beim Eindampfen von Formaldehydlösung mit Ammoniak; es ist ein farbloses, krystallinisches Pulver, welches sich beim Erhitzen verflüchtigt, ohne zu schmelzen. Es löst sich in 1,5 Tln. Wasser und in 10 Tln. 85%igem Alkohol mit alkalischer Reaktion.

Das D.A.B. VI stellt folgende Anforderungen an Urotropin: Farbloses, krystallinisches Pulver, von anfangs süßem, später bitterlichem Geschmacke. Beim Erhitzen verflüchtigt es sich, ohne zu schmelzen. Die wäßrige Lösung bläut Lackmuspapier sehr schwach, wird durch Phenolphthaleinlösung aber nicht gerötet. Beim Erhitzen der wäßrigen Lösung

<sup>1</sup> FR. LIPPICH: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, 76, 241, 255, 321, 401.

<sup>2</sup> K. WEBER u. B. TOLLENS: Vgl. S. 1038.

<sup>3</sup> R. J. COLLINS u. P. J. HANZLIK: Journ. Biol. Chem. 1916, 25, 231; C. 1916, II, 1075.

<sup>4</sup> M. BRUGGER: Diss. Freiburg 1921.

<sup>5</sup> H. FINCKE: Biochem. Zeitschr. 1913, 52, 219. — Vgl. dazu WILLSTÄTTER: Liebigs Ann. 421, 43.

<sup>6</sup> B. WAGNER: Tabellen zum Eintauchrefraktometer (Sondershausen 1907). — Vgl. auch L. TH. REICHER und F. C. M. JANSEN: Chem. Weekbl. 1912, 9, 104; C. 1912, I, 949.

<sup>7</sup> E. MÜLLER u. W. LÖW: Zeitschr. analyt. Chem. 1924, 64, 297.

<sup>8</sup> E. RIEGLER: Zeitschr. analyt. Chem. 1901, 40, 92.

<sup>9</sup> G. B. FRANKFORTER u. R. WEST: Journ. Amer. Chem. Soc. 1905, 27, 714; C. 1905, II, 516. — Vgl. auch G. W. HEIMROD u. P. A. LEVENE: Biochem. Zeitschr. 1910, 29, 31.

<sup>10</sup> E. RIMINI u. T. JONA: Giorn. Farmac. Chim. 1911, 61, 49; C. 1912, I, 1147.

<sup>11</sup> LEGLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1883, 16, 1333. — Vgl. dazu G. ROMIJN (Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 18), SCHIFF (Chem.-Ztg. 1903, 27, 14), R. HERRMANN (Chem.-Ztg. 1911, 35, 25) und F. MACH u. R. HERRMANN (Zeitschr. analyt. Chem. 1923, 62, 105).

(1+19) mit verd. Schwefelsäure tritt der Geruch des Formaldehyds auf. Fügt man hierauf Natronlauge im Überschuß hinzu und erwärmt von neuem, so entwickelt sich Ammoniak. Fügt man zu 5 ccm der wäßrigen Lösung (1+19) 5 Tropfen Silbernitratlösung, so entsteht ein weißer Niederschlag, der sich beim Umschütteln im Überschuß der Hexamethylentetraminlösung wieder löst. Die wäßrige Lösung (1+19) darf weder durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Schwermetallsalze) noch durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure) verändert werden. Nach Zusatz von 2 ccm Salpetersäure und einigen Tropfen Silbernitratlösung darf sie höchstens eine Opalescenz zeigen (Salzsäure). Werden 5 ccm der wäßrigen Lösung (1+19) mit 5 Tropfen NESSLERs Reagens versetzt, so darf nach einmaligem Aufkochen weder eine Färbung noch eine Trübung auftreten (Ammoniumsalze—Parafomaldehyd). Die Lösung von 0,1 g Hexamethylentetramin in 2 ccm Schwefelsäure muß farblos sein (Fremde organische Stoffe).

0,2 g Hexamethylentetramin dürfen nach dem Verbrennen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

### a) Nachweis.

Reaktion nach LABAT<sup>1</sup>. Mischt man 1 ccm einer 1%igen Hexamethylentetraminlösung mit 2 ccm Schwefelsäure und erhitzt zum Sieden, so entsteht eine smaragdgrüne Färbung. Empfindlichkeitsgrenze = 0,001%.

Reaktion nach CALZOLARI<sup>2</sup>. Setzt man zu einer Lösung von Hexamethylentetramin gleiche Mengen gesättigter Magnesiumsulfatlösung und gesättigter, frisch bereiteter Kaliumferricyanidlösung, so entsteht ein kristallinischer Niederschlag von  $\text{MgKFe}(\text{CN})_6 \cdot 2 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ . Der Niederschlag tritt noch in 0,1%iger Lösung ein.

### b) Bestimmung.

α) Alkalimetrische Bestimmung. Hexamethylentetramin läßt sich als einsäurige Base mit N.-Salzsäure oder N.-Schwefelsäure unter Anwendung von Tropäolin 00 als Indicator titrieren<sup>3</sup>. Der Farbumschlag ist um so schärfer, je konzentrierter die Hexamethylentetraminlösung ist. Bei ungefähr N.-Hexamethylentetraminlösungen gilt die Titration als beendet, sobald der Farbton der Titrationsflüssigkeit jenem einer Lösung der gleichen Menge Indicator in 0,0022 N.-Säure entspricht. 1 ccm N.-Säure = 0,1401 g Hexamethylentetramin.

β) Jodometrische Bestimmung nach STÜWE<sup>4</sup>. Erhitzt man Hexamethylentetramin mit verdünnten Säuren, so spaltet es sich in seine Komponenten. Versetzt man nun die Formaldehydlösung mit Quecksilberchlorid-Kaliumjodidlösung und Natronlauge, so findet sofort Reduktion zu metallischem Quecksilber statt (S. 1041). Das Quecksilber wird nach dem Ansäuern in einen Überschuß von 0,1 N.-Jodlösung gelöst und der Überschuß an Jod mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert. Man verfährt folgendermaßen: 0,5 g Hexamethylentetramin werden in einem 250 ccm-Kolben mit 100 ccm Wasser und 10 ccm 25%iger Salzsäure versetzt. Auf den Kolben setzt man ein etwa 70 cm langes Glasrohr und erwärmt  $\frac{1}{4}$  Stunde im Wasserbade. Nach dem Erkalten spült man den etwa in die Glasröhre gestiegenen Formaldehyd in den Kolben zurück, nimmt das Glasrohr ab und füllt bis zur Marke auf. Hierauf stellt man sich NESSLERs Reagens nach folgender Vorschrift her: Man löst 1 g Quecksilberchlorid in 20 g Wasser, gibt 0,5 g Gummi arabicum und 3 g Kaliumjodid hinzu und schwenkt um bis zur Lösung. Alsdann setzt man 10 ccm 15%ige Natronlauge hinzu und läßt dazu 10 ccm = 0,02 g der obigen Lösung fließen. Nach einigem Umschwenken säuert man mit 20 ccm verd. Essigsäure an. Falls Erwärmung eintritt, ist abzukühlen, um dann mit 20 ccm 0,1 N.-Jodlösung das ausgeschiedene Quecksilber wieder in Lösung zu bringen, und titriert den Jodüberschuß mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurück. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,001168 g Hexamethylentetramin.

## 2. Acetaldehyd.

Acetaldehyd,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CHO}$ , ist eine farblose, leicht bewegliche, stechend riechende Flüssigkeit, die mit Wasser und Alkohol unter Temperaturerhöhung und mit Äther ohne solche mischbar ist. Spez. Gewicht ( $d_{40}^{18}$ ): 0,7834; Siedepunkt (760): 20,2°. Acetaldehyd wird aus konzentrierter wäßriger Lösung durch

<sup>1</sup> LABAT: Journ. Pharm. et Chim. 1909, 1, 433. MERCKs Reagenzien-Verzeichnis 1929, S. 334.

<sup>2</sup> CALZOLARI: Ber. ges. Physiol. 1924, 27, 226; C. 1925, I, 137.

<sup>3</sup> I. M. KOLTHOFF: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1921, 115, 177.

<sup>4</sup> STÜWE: Arch. Pharm. 1914, 252, 433.

Calciumchlorid ausgesalzen; mit Alkalien zersetzt er sich unter gelbbrauner Trübung (Bildung von Aldol bzw. Aldehydharz). Durch Sättigen mit Ammoniak entsteht Aldehydammoniak, ein weißer Niederschlag, der zur Reindarstellung des Acetaldehyds dienen kann. An der Luft oxydiert er sich zu Essigsäure.

Acetaldehyd polymerisiert sich, namentlich bei Gegenwart geringer Mengen anorganischer Säuren, leicht, bei gewöhnlicher Temperatur zu Paraldehyd, unter  $0^{\circ}$  zu Metaldehyd.

Paraldehyd<sup>1</sup>,  $(\text{CH}_3 \cdot \text{CHO})_8$ , ist eine wasserhelle, angenehm riechende, bei  $124^{\circ}$  siedende Flüssigkeit, die keine Aldehydreaktionen gibt und bei der Destillation mit Säuren wieder in Acetaldehyd übergeführt wird.

Metaldehyd,  $(\text{CH}_3 \cdot \text{CHO})_4$ , besteht aus in Wasser unlöslichen weißen Krystallnadeln, die bei  $100^{\circ}$  unter teilweiser Rückbildung von Acetaldehyd sublimieren.

### a) Nachweis von Acetaldehyd.

Soweit in einer Lösung oder in einem Wasserdampfdestillat außer Acetaldehyd keine anderen Aldehyde vorhanden sind, kann der Acetaldehyd durch die allgemeinen Aldehydreaktionen (S. 1023) nachgewiesen werden, insbesondere auch durch die Schmelzpunkte seiner Kondensationsverbindungen (S. 1024). Acetaldehyd gibt ebenso wie Äthylalkohol die Jodoformreaktion nach LIEBEN (S. 1007).

Die nachstehenden Reaktionen sind für Acetaldehyd gegenüber Formaldehyd und Aceton eindeutig.

#### α) Reaktion mit Quecksilberoxyd.

Versetzt man nach S. M. AULD und A. HANTZSCH<sup>2</sup> einige Tropfen 0,1 N.-Quecksilberchloridlösung mit Kalilauge bis zur stark alkalischen Reaktion und mit 2—3 ccm der zu prüfenden Lösung, so wird bei einer Aldehydkonzentration bis 1:2000 der Quecksilberoxydniederschlag unter Bildung von Trimercuri-diacetaldehyd  $(2 \text{ C}_2\text{H}_4\text{O} \cdot 3 \text{ HgO})_x$ , weiß. Ist die Konzentration der Aldehydlösung geringer, so wird der Quecksilberoxydniederschlag mehr oder weniger hellgelb; in diesem Falle wird das unveränderte Quecksilberoxyd durch verdünnte Essigsäure gelöst, und es bleibt der weiße Trimercuri-diacetaldehyd zurück; Empfindlichkeitsgrenze 1:6000.

Nach A. LEYS<sup>3</sup> löst man 1 g Quecksilberoxyd in 100 ccm 5%iger Natriumsulfidlösung, setzt die sehr verdünnte auf Aldehyd zu prüfende Lösung hinzu und macht dann mit 10%iger Kaliumcarbonatlösung schwach alkalisch. Beim Vorhandensein der geringsten Mengen Acetaldehyd bildet sich sofort ein in Wasser und Alkohol unlöslicher weißer Niederschlag von  $\text{Hg} \cdot \text{CH} \cdot \text{CH} \cdot \text{Hg}$ .

Formaldehyd, Furfurol, Aldosen und gewisse aromatische Aldehyde geben die Reaktion nicht, sondern nur solche Aldehyde, welche die Gruppe  $-\text{CH}_2 \cdot \text{CHO}$  enthalten. Die Reaktion ist besonders für den Nachweis von Acetaldehyd in Formaldehyd geeignet.

Gegenüber S. L. LANGEDLJK<sup>4</sup>, der das Verfahren von AULD und HANTZSCH zur quantitativen Bestimmung des Acetaldehyds angewendet hat, weist J. WAGNER<sup>5</sup> nach, daß es viel zu hohe Ergebnisse liefert; er ist der Ansicht, daß dies darauf zurückzuführen sei, daß ein Teil des weißen Stoffes nicht aus Trimercuri-diacetaldehyd, sondern aus anderen Quecksilberaldehydverbindungen bestehe, deren Quecksilbergehalt nicht sehr verschieden sei, die aber sehr ungleichen Acetaldehydmengen äquivalent seien.

<sup>1</sup> Das Deutsche Arzneibuch VI stellt an den als Schlafmittel dienenden Paraldehyd bestimmte Reinheitsanforderungen, auf die hier verwiesen sei.

<sup>2</sup> S. M. AULD u. A. HANTZSCH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, **38**, 2677.

<sup>3</sup> A. LEYS: Journ. Pharm. et Chim. 1905, [6] **22**, 107; C. 1905, **II**, 855.

<sup>4</sup> S. L. LANGEDLJK: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1927, **46**, 218; C. 1927, **II**, 302.

<sup>5</sup> J. WAGNER: Biochem. Zeitschr. 1928, **194**, 441.

### β) Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Piperidin, Piperazin sowie sekundären Aminen.

L. SIMON<sup>1</sup>, der Entdecker der Reaktion, führte sie mit Trimethylamin aus; E. RIMINI<sup>2</sup> hat dann festgestellt, daß nicht das Trimethylamin sich an der Reaktion beteiligt, sondern dessen Verunreinigung durch sekundäre aliphatische Amine; mit allen letzteren, ferner mit Piperidin und Piperazin, tritt die Blaufärbung mit Acetaldehyd in Gegenwart von Nitroprussidnatrium auf. Empfindlichkeitsgrenze 1:20000; nach  $\frac{1}{4}$  Stunde verschwindet die Färbung. Die Reaktion läßt sich teilweise durch Zusatz von einigen Tropfen Eisessig verschärfen. Außer dem Acetaldehyd geben auch Paraldehyd und weniger stark Propionaldehyd und Acrolein eine Blaufärbung; Formaldehyd, Benzaldehyd, Salicylaldehyd und Furfurol sowie Aceton geben sie nicht.

K. H. BARRENSCHEEN und K. BRAUN<sup>3</sup> versetzen 5 ccm der zu untersuchenden Lösung mit 2 Tropfen gesättigter Nitroprussidnatriumlösung und 2 Tropfen des

| Aminlösung                | Färbung              | Empfindlichkeit bis 1: |
|---------------------------|----------------------|------------------------|
| Dimethylamin (30%) .      | tiefblau—blaugrün    | 80 000                 |
| Diäthylamin (30%) .       | blauviolett—grünlich | 80 000                 |
| Piperazin (50%) . . . . . | tiefblau—gelbgrün    | 160 000                |
| Piperidin . . . . .       | tiefblau—gelbgrün    | 80 000                 |

betreffenden Amins. Die Farbreaktionen mit den einzelnen Aminen sind nebenstehende.

I. M. KOREMAN<sup>4</sup> führt die Reaktion in der Weise aus, daß er einen Tropfen der zu untersuchenden Lösung auf

Filterpapier tropft und dann Piperidin und Nitroprussidnatrium hinzugibt. Bei Gegenwart von Acetaldehyd entsteht ein gelber Fleck mit blauem Rand; Aceton gibt Rosafärbung.

### γ) Reaktion mit Metaphenyldiamin.

Nach W. WINDISCH<sup>5</sup> versetzt man die zu prüfende wäßrige oder alkoholische Lösung (20 ccm) mit 5 ccm einer frisch bereiteten wäßrigen 2%igen Lösung von salzsauren Metaphenyldiamin. Bei Gegenwart von Acetaldehyd entsteht eine gelbe Färbung, in konzentrierteren Lösungen eine braune Färbung oder Abscheidung einer dunkelrotbraunen harzigen Masse, deren wäßrige oder alkoholische Lösung im durchfallenden Lichte blutrot gefärbt ist und im auffallenden Lichte grüne Fluoreszenz zeigt. Durch Alkalilauge und Ammoniak verschwindet unter Bildung einer flockigen Ausscheidung die Färbung; sie tritt aber bei Zusatz von Salzsäure wieder ein. Empfindlichkeitsgrenze 1:200000. Stärkste Färbung nach 30 Minuten.

### δ) Reaktion mit Benzidinchlorhydrat nach N. K. SMITH<sup>6</sup>.

Benzidinchlorhydrat liefert mit Form- und Acetaldehyd Gelb- bzw. Braunfärbung, die aber bei Acetaldehyd viel früher eintritt als bei Formaldehyd, z. B. in 0,1%iger Lösung bei Acetaldehyd in 10 Minuten und bei Formaldehyd nach einigen Stunden. Man arbeitet mit 5—0,01%igen Aldehydlösungen und gibt zu 5 ccm Aldehydlösung 5 ccm Reagens.

Das Reagens wird nach TREADWELL<sup>7</sup> hergestellt; eine etwaige leichte Gelbfärbung der Lösung wird durch kurzes Behandeln mit Entfärbungskohle auf dem Wasserbade beseitigt.

<sup>1</sup> L. SIMON: Compt. rend. Paris 1897, **125**, 1105; C. 1898, I, 238.

<sup>2</sup> E. RIMINI: *Annali Farmacoterapia e Chim.* 1898, **249**; C. 1898, II, 277. — Vgl. auch L. LEWIN: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1899, **32**, 3389.

<sup>3</sup> K. H. BARRENSCHEEN u. K. BRAUN: *Biochem. Zeitschr.* 1931, **233**, 296.

<sup>4</sup> I. M. KOREMAN: *Journ. chem. Ind. (russ.)* 1931, **8**, 508; C. 1931, II, 601.

<sup>5</sup> W. WINDISCH: *Zeitschr. Spiritusind.* 1886, **9**, 519; *Chem.-Ztg.* 1887, **11**, Rep. 24; *Zeitschr. analyt. Chem.* 1888, **27**, 514.

<sup>6</sup> N. K. SMITH: *Chem. Trade Journ.* 1922, **70**, 480; C. 1922, IV, 110.

<sup>7</sup> F. P. TREADWELL: *Analyt. Chemistry* 1919, **2**, 715. — *Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie*, 11. Aufl., **2**, 623 (1923).

### ε) Mikrochemischer Nachweis<sup>1</sup>.

Der Nachweis des Acetaldehyds in verdünnten Lösungen beruht auf Anwendung der Chinaldinsynthese. Nach Zusatz von Schwefelsäure destilliert man etwa  $\frac{1}{4}$  der zu untersuchenden Flüssigkeit ab und schüttelt das Destillat nach Ansäuern mit wenig Essigsäure mit einem Tropfen Anilin. Bei Gegenwart von Aldehyden stellt sich alsbald Trübung ein. Nimmt diese nicht weiter zu, so schüttelt man mit Petroläther aus, löst den Verdunstungsrückstand der petrolätherischen Lösung mit der vierfachen Menge konz. Salzsäure und läßt diese Lösung 1 Stunde am Rückflußkühler gelinde sieden. Die saure Flüssigkeit wird abgedampft, der Rückstand mit Wasser ausgezogen und ein Tropfen des Auszuges mit einem Wassertröpfchen in Berührung gebracht, das mit Kaliumferrocyanid und Salzsäure versetzt ist. Aus einem zweiten Tropfen wird das Chinaldin mit einem Übermaß von Platinlösung gefällt. In der ersten Probe entstehen lichtgelbe Kuboide ( $20-30 \mu$ ), in der zweiten rötlichgelbe Leisten ( $300-400 \mu$ ), meist zu Rosetten verwachsen.

Viel weniger empfindlich, aber auch in Gegenwart von Formaldehyd recht brauchbar ist die Kondensation des Acetaldehyds mit Semicarbazid. Man muß stark einengen und die Randkruste zerreiben, da das Semicarbazon leicht löslich und zur Bildung übersättigter Lösungen geneigt ist. Man erhält Rhomboide und Linsen ( $300 \mu$ ), stark polarisierend, mit einem Auslöschungswinkel von  $33^\circ$ . Formaldehyd reagiert auffallenderweise träger als Acetaldehyd. Sein Semicarbazon ist schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser und bildet stark übersättigte Lösungen, die langsam (in 10 Minuten) eine gelatinöse Masse von feinen Nadeln ( $6-8 \mu$ ) fallen lassen.

### b) Bestimmung des Acetaldehyds.

Wenn in einer Lösung oder in einem Wasserdampfdestillat als einziger Aldehyd nur Acetaldehyd vorhanden ist, so kann dessen Bestimmung nach den oben (S. 1031) aufgeführten allgemeinen Methoden zur Bestimmung von Aldehyden erfolgen. Insbesondere sind von diesen zur Bestimmung des Acetaldehyds empfohlen bzw. besonders ausgearbeitet das Bisulfitverfahren von RIPPEN (S. 1032), das argentometrische Verfahren von W. PONNDORF (S. 1034), das Wasserstoffsperoxyd-Verfahren (S. 1040) und das Hydroxylamin-Verfahren (S. 1033).

Brauchbare Verfahren zur Bestimmung von Acetaldehyd neben anderen Aldehyden, insbesondere neben Formaldehyd, sind nur wenig bekannt. Das von S. L. LANGEDIJK vorgeschlagene Quecksilbersperoxyd-Verfahren (S. 1045) liefert nach J. WAGNER zu hohe Werte; brauchbarer scheint das Verfahren von D. VORLÄNDER (S. 1027) zu sein.

Zur Bestimmung geringer Mengen Acetaldehyd sind zwei colorimetrische Verfahren vorgeschlagen, die aber noch nicht hinreichend nachgeprüft zu sein scheinen.

#### Colorimetrische Bestimmung des Acetaldehyds.

α) Das Verfahren zum Nachweis des Acetaldehyds mit Metaphenylendiamin nach W. WINDISCH (S. 1046) hat A. BEYTHIEN<sup>2</sup> zu einem colorimetrischen Bestimmungsverfahren ausgebildet.

Folgende Reagenzien sind erforderlich:

I. 2%ige wäßrige Lösung von salzsaurem Metaphenylendiamin. Die Lösung muß farblos sein. Bräunlich gewordene Lösungen können durch Tierkohle rasch entfärbt werden.

II. 0,1%ige wäßrige Acetaldehydlösung. Die Lösung wird jedesmal frisch hergestellt aus einer 0,5%igen Lösung, die in brauner, gut verschlossener Flasche monatelang ihren Aldehydgehalt unverändert beibehält.

20 ccm der zu untersuchenden Lösung werden mit 5 ccm Wasser und 5 ccm der Metaphenylendiaminlösung versetzt und umgeschüttelt. Gleichzeitig stellt man sich 6 Vergleichslösungen her, indem man in genau gleichgeformte Reagensgläser 1, 2, 4, 8, 10 und 20 ccm der Aldehydlösung II und 5 ccm Lösung I gibt

<sup>1</sup> BEHRENS-KLEY: Organ. mikrochem. Analyse 1922, S. 68.

<sup>2</sup> A. BEYTHIEN: Z. 1924, 48, 169.



und alle mit Wasser bis zur gleichen Höhe auffüllt. Nach 30 Minuten wird der Aldehydgehalt durch colorimetrische Vergleichung ermittelt.

β) Das Verfahren zum Nachweis des Acetaldehyds mit Benzidinchlorhydrat (S. 1046) hat N. K. SMITH auch zur Bestimmung des Acetaldehyds vorgeschlagen. Man bereitet Vergleichslösungen von verschiedenem Gehalt an Acetaldehyd und vergleicht die Färbungen nach 30 Minuten.

### 3. Benzaldehyd.

Benzaldehyd,  $C_6H_5 \cdot CHO$ , ist eine farblose, stark lichtbrechende, mit Wasserdämpfen flüchtige, charakteristisch riechende Flüssigkeit. Siedepunkt  $179^{\circ}$ , Erstarrungspunkt  $-13,5^{\circ}$ . Spez. Gewicht ( $d_{4}^{15^{\circ}}$ ) 1,0504. Löslich in mehr als 300 Thn. Wasser, in 1,4 Thn. 70%igem Alkohol. Benzaldehyd oxydiert sich schon beim Stehen an der Luft zu Benzoesäure.

Nach den Anforderungen des Deutschen Arzneibuches darf Benzaldehyd weder Nitrobenzol noch Chlorverbindungen enthalten.

#### a) Nachweis von Benzaldehyd.

Soweit in einer Lösung oder in einem Wasserdampfdestillat außer Benzaldehyd keine anderen Aldehyde vorhanden sind, kann der Benzaldehyd durch die allgemeinen Aldehydreaktionen (S. 1023) nachgewiesen werden, insbesondere auch durch die Schmelzpunkte seiner Kondensationsverbindungen (S. 1024).

Die nachstehenden Reaktionen sind für Benzaldehyd eindeutig.

α) **Überführung in Indigo**<sup>1</sup>. Man übergießt 1 Tropfen Benzaldehyd mit 1—2 ccm rauchender Salpetersäure, schüttelt 1—2 Minuten (Bildung von o-Nitrobenzaldehyd), verdünnt mit ungefähr der gleichen Menge Wasser, setzt 1 ccm Aceton<sup>2</sup> hinzu und dann rasch Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion. In der Flüssigkeit entsteht ein blauer Niederschlag von Indigo, der mit Chloroform ausgeschüttelt werden kann.

β) **Überführung in Malachitgrün nach O. FISCHER**<sup>3</sup>. Beim Erhitzen der zu prüfenden Lösung mit dem doppelten Volumen Dimethylanilin und konz. Schwefelsäure auf  $150^{\circ}$  bis zu schwach bräunlicher Färbung bildet sich bei Anwesenheit von Benzaldehyd Leukomalachitgrün. Verdünnt man das Reaktionsgemisch mit dem doppelten Volumen Wasser, gibt etwas Kaliumbichromat hinzu und versetzt die orangegelbe Mischung mit Natriumacetat, so färbt sich die Lösung grün und scheidet Malachitgrün ab, das sich in Essigsäure löst.

Mit m-Phosphorsäureäthylester und Dimethylanilin bildet Benzaldehyd nach K. LANGHELD<sup>4</sup> schon bei schwachem Erwärmen Malachitgrün.

γ) **Nachweis nach H. MELZER**<sup>5</sup>. Man versetzt einige Tropfen der zu prüfenden Lösung mit 2 ccm konz. Schwefelsäure sowie mit 1—2 Tropfen Phenol und escheiden sich bei nicht allzu verdünnten Lösungen rote Harzmassen ab. Läßt man erkalten, fügt 10 ccm Wasser und soviel 20%ige Kalilauge hinzu, daß die Flüssigkeit deutlich alkalisch reagiert, so entsteht bei Anwesenheit von Benzaldehyd eine violettblaue Färbung. Schüttelt man nach dem Ansäuern mit Äther aus, so nimmt dieser den Farbstoff auf. Nach dem Verdunsten mit

<sup>1</sup> L. ROSENTHALER: Der Nachweis organischer Verbindungen, S. 133. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

<sup>2</sup> Nach G. REIF (Z. 1931, 62, 82) gibt Benzaldehyd mit Aceton Dibenzalacetone, das sich in Schwefelsäure mit orangeroter Farbe löst.

<sup>3</sup> O. FISCHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1878, 11, 950; 1879, 12, 796; Ann. Chem. 1881, 206, 122.

<sup>4</sup> K. LANGHELD: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, 43, 1857.

<sup>5</sup> H. MELZER: Zeitschr. analyt. Chem. 1898, 37, 345.

Wasser und Alkohol aufgenommen, färbt sich die Lösung auf Zusatz von Alkalien blau; auf Zusatz von Säure wird sie entfärbt.

Andere Aldehyde geben ähnliche Farbenreaktionen.

d) **Nachweis nach BARBET und JANDRIER**<sup>1</sup>. Bringt man in ein Reagensglas einige Zentigramm  $\beta$ -Naphthol, 2 ccm hochprozentigen Alkohol und 1 ccm reinste konz. Schwefelsäure, die man an der Wandung herabfließen läßt, so entsteht beim Vorhandensein von Benzaldehyd eine karmoisinrote Färbung; mit fast allen anderen Aldehyden entsteht eine gelbe Färbung mit grünlicher Fluoreszenz. Beim Mischen der Flüssigkeiten wechselt oft die Färbung. Die Schwefelsäure muß frei von nitrosen Verbindungen sein.

e) **Nachweis mit Sesamöl und Salzsäure**. Schüttelt man 1 ccm Sesamöl, 4 ccm Petroläther und 10 ccm konz. Salzsäure ( $D = 1,19$ ) mit 2—3 Tropfen einer 1%igen Aldehydlösung, so entsteht nach R. REICH<sup>2</sup> bei Benzaldehyd eine rotgelbe, bei Vanillin eine blauviolette, bei Zimtaldehyd eine rotviolette und mit Furfurol eine rote Färbung. — Diese Farbreaktionen werden durch das im Sesamöl vorhandene Sesamol (Oxyhydrochinon-methylenäther) verursacht.

z) **Mikrochemischer Nachweis**<sup>3</sup>. Mit Phenylhydrazin und seinen Homologen, mit Naphthylhydrazin und mit o-Phenylendiamin gibt Benzaldehyd auch in stark verdünnten Lösungen fast augenblicklich Niederschläge, die schnell zu farblosen Nadeln krystallisieren. — Mit Semicarbazidchlorhydrat reagiert Benzaldehyd sehr energisch. Es entstehen farblose, schiefwinklige Stäbchen (250  $\mu$ ) mit negativer Doppelbrechung und gerader Auslöschung. — Durch Erwärmen mit Chromsäure und Schwefelsäure wird Benzaldehyd zu Benzoesäure oxydiert, welche durch Sublimation isoliert werden kann.

### b) Bestimmung des Benzaldehyds.

Wenn in der zu untersuchenden Substanz oder Lösung — nötigenfalls im Destillat — Benzaldehyd als einziger Aldehyd vorhanden ist, so kann seine Bestimmung nach den allgemeinen Aldehydbestimmungsverfahren, insbesondere nach den Verfahren von RIPPER (S. 1032), FEINBERG (S. 1033), PONNDORF (S. 1034) und E. v. MEYER (S. 1032) erfolgen.

Für die Bestimmung des Benzaldehyds sind ferner noch folgende Verfahren empfohlen:

$\alpha$ ) **Gewichtsanalytisches Verfahren mit Phenylhydrazin**. Für dieses von C. DENNER<sup>4</sup> herrührende, besonders für kleine Aldehydmengen geeignete Verfahren ist von H. HERISSEY<sup>5</sup> folgende Ausführungsform empfohlen worden: Eine Lösung von 1 ccm frisch destilliertem Phenylhydrazin und 0,5 ccm Eisessig in 100 ccm Wasser und die wäßrige Lösung des Benzaldehyds läßt man 24 Stunden bei 15—20° stehen oder man erwärmt 20 Minuten auf dem Wasserbade und sammelt das ausgeschiedene Hydrazon in einem GOOCH-Tiegel, wäscht mit kaltem Wasser aus und trocknet bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum. 1 Tl. Hydrazon  $\times 0,541 =$  Benzaldehyd.

L. CUNIASSE und S. DE RACZKOWSKI<sup>6</sup> setzen zu der zu untersuchenden Lösung 3—4 ccm einer frisch bereiteten Auflösung von 2 g salzsaurem Phenyl-

<sup>1</sup> BARBET u. JANDRIER: Ann. Chim. analyt. appl. 1896, 1, 325; Vierteljahrsschr. Nahrungs- u. Genußm. 1896, 11, 558.

<sup>2</sup> R. REICH: Z. 1908, 16, 452.

<sup>3</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, 1922. S. 73.

<sup>4</sup> C. DENNER: Pharm. Zentralh. 1887, 28, 527; Zeitschr. analyt. Chem. 1890, 29, 228.

<sup>5</sup> H. HERISSEY: Journ. Pharmac. Chim. 1906, [6] 23, 60; Z. 1907, 13, 716. — Vgl. auch W. DENIS u. P. B. DUNBAR: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1909, 1, 256; C. 1909, II, 1703.

<sup>6</sup> L. CUNIASSE u. S. DE RACZKOWSKI: Moniteur scient. [4] 8, II, 915; Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 403.

hydrazin und 3 g kryst. Natriumacetat in 20 ccm Wasser, schwenken um und verdünnen mit Wasser auf das doppelte Volumen. Man filtriert das ausgeschiedene Benzyliden-Phenylhydrazin ( $C_6H_5 \cdot NH \cdot N : CH \cdot C_6H_5$ ) ab, wäscht es mit sehr schwach alkoholischem Wasser aus und löst es schließlich durch wiederholtes Ausziehen des Filters mit je 10 ccm absol. Alkohol. Die alkoholische Lösung läßt man im Vakuum verdunsten und wägt den Rückstand.

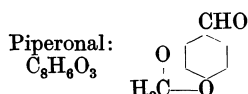
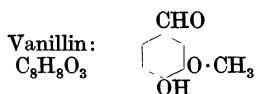
β) Verfahren durch Überführung in Benzoessäure. F. MORVILLEZ und DÉFOSSEZ<sup>1</sup> führen den Benzaldehyd durch Oxydation mit Chromsäure — auch mit Kaliumpermanganat — in Benzoessäure über und lösen diese in einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel (Chloroform). 25 ccm der Benzaldehyd enthaltenden wäßrigen Lösung werden mit 25 ccm 5%iger Kaliumbichromatlösung und 50 ccm unter Abkühlung in kleinen Portionen zuzusetzender Schwefelsäure versetzt. Nach etwa 1½ Stunden werden unter Abkühlung 30 ccm Wasser zugesetzt und die Lösung fünfmal mit Chloroform ausgezogen. Die vereinigten Chloroformauszüge werden zur Entfernung der Schwefelsäure mit Wasser gewaschen, die Chloroformlösung langsam verdunstet und der Rückstand gewogen. Benzoessäure  $\times 0,8688 =$  Benzaldehyd. Die Bestimmung kann auch titrimetrisch erfolgen, indem man die Chloroformlösung mit 20 ccm 0,1 N-Natronlauge ½ Stunde schüttelt und den Überschuß an Natronlauge unter Verwendung von Phenolphthalein mit 0,1 N.-Schwefelsäure zurücktitriert. 1 ccm 0,1 N.-Natronlauge = 0,106 g Benzaldehyd.

#### γ) Sonstige Verfahren.

Colorimetrisches Verfahren mit Fuchsinbisulfidlösung von A. G. WOODMAN u. E. F. LYFORD<sup>2</sup> — Verfahren von L. PALFRAY, S. SABETAY und D. SONTAG<sup>3</sup>, beruhend auf der CANNIZZAROSCHEN Umlagerung beim Erhitzen mit Kalilauge.

## 4. Vanillin und Piperonal.

Diese beiden Protocatechualdehyde werden vielfach zum Aromatisieren bzw. Parfümieren von Lebensmitteln und kosmetischen Mitteln verwendet.



Vanillin (Methyl-protocatechualdehyd) bildet weiße Nadeln mit einem charakteristischen Geruch und Geschmack vom Schmelzpunkt 80,5—81,5°, die im Kohlendioxidstrome von 115° an unzersetzt sublimierbar sind. Es ist leicht löslich in Alkohol, Äther, Chloroform und löst sich in 100 Tln. Wasser von 20°; die wäßrige Lösung rötet Lackmuspapier. Der dem Vanillin entsprechende Äthylaldehyd kommt für die gleichen Zwecke als Bourbonal in den Handel.

Auf die Anforderungen, welche das Deutsche Arzneibuch VI an Vanillin stellt, sei hier verwiesen.

Piperonal, Heliotropin (Methylen-protocatechualdehyd) bildet weiße glänzende Krystalle mit heliotropartigem Geruch vom Schmelzpunkt 37°. Es ist leicht löslich in Alkohol und Äther und löst sich in 500—600 Tln. Wasser.

### a) Vanillin.

α) Nachweis. Man erkennt Vanillin meist leicht an seinem charakteristischen Geruch.

<sup>1</sup> F. MORVILLEZ u. DÉFOSSEZ: Journ. Pharm. et Chim. 1927, [8] 6, 204; C. 1927, II, 2217.

<sup>2</sup> A. G. WOODMAN u. E. F. LYFORD: Journ. Amer. Chem. Soc. 1908, 30, 1607; C. 1908, II, 2040.

<sup>3</sup> L. PALFRAY, S. SABETAY u. D. SONTAG: Compt. rend. Paris 1932, 194, 1502; C. 1932, II, 257.

Vanillin liefert mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen Kondensationsprodukte, die unter anderem durch ihre Schmelzpunkte (S. 1024) gekennzeichnet sind.

Für den Nachweis von Vanillin ist eine Reihe von Farbenreaktionen vorgeschlagen, die aber zum Teil unsicher sind:

1. Nach F. X. MOERK<sup>1</sup>. Man setzt zu der zu prüfenden Substanz Bromwasser in geringem Überschuß und darauf tropfenweise frisch bereitete 10%ige Ferrosulfatlösung. Beim Vorhandensein von Vanillin färbt sich die Lösung grünblau. Der Farbstoff geht nach TH. v. FELLEBERG (S. 1052) beim Schütteln mit Amylalkohol in diesen über. Versetzt man die Amylalkohollösung mit einem Tropfen Ammoniak, so tritt Rotfärbung ein.

2. Nach KAHN<sup>2</sup>. Eine wäßrige Vanillinlösung gibt mit verd. Eisenchloridlösung eine Blaufärbung, die beim Kochen in Braun übergeht; beim Erkalten scheidet sich ein weißer Niederschlag von Dihydrovanillin ab; Schmelzpunkt 302—305°.

3. Nach C. ESTES<sup>3</sup>. Als Reagens dient eine Lösung von Quecksilber in 10 Tln. konz. Salpetersäure ( $D = 1,42$ ), die mit 25 Tln. Wasser verdünnt ist. Die auf Vanillin zu prüfende Substanz wird in 5 ccm Wasser gelöst, die Lösung mit 0,5 ccm des Reagens versetzt und 5 Minuten gekocht. Vanillin erzeugt eine violette bis rotviolette Färbung.

4. Nach J. GRÜSS<sup>4</sup>. Beim Zusatz von Vanillin zu einer Lösung von 1 Tl. Vanadinsäure in 4 Tln. Phosphorsäure entstehen rotbraune Krystallnadeln (Vanillinin).

5. Nach J. H. KASTLE<sup>5</sup>. Ein Gemisch von 5 ccm Phenol und 3 ccm konz. Schwefelsäure gibt mit den geringsten Mengen Vanillin zunächst Gelb-, dann Rotfärbung und bei einige Minuten langem Erhitzen auf 160—170° zuerst Blutrot-, dann Schwarzfärbung. Bei Zusatz von Wasser und einigen Tropfen 2 N.-Natronlauge entsteht eine tief dunkelrote Lösung.

6. Sonstige Reaktionen. Löst man 0,1 g Vanillin in 1 ccm Eisessig und fügt konz. Schwefelsäure hinzu, so entsteht eine grünblaue Färbung; löst man 0,1 g Vanillin in 1 ccm Alkohol und gibt 1 ccm konz. Schwefelsäure hinzu, so entsteht eine grüne Lösung, die beim Erwärmen tief weinrot bis violett wird. — BONNEMA<sup>6</sup> hat eine Reaktion mit Sandelöl beschrieben.

7. Mikrochemischer Nachweis. H. BEHRENS<sup>7</sup>, EMICH<sup>8</sup>, C. GRIEBEL<sup>9</sup> und M. WAGENNAAR<sup>10</sup> haben eine Reihe von Verfahren beschrieben, auf die hier verwiesen sei.

**β) Bestimmung.** In Lösungen, die außer Vanillin keine anderen Aldehyde und keine Ketone enthalten, können zur Bestimmung des Vanillins die Verfahren von M. RIPPER (S. 1032), L. LAUTENSCHLÄGER (S. 1032)<sup>11</sup> und von B. G. FEINBERG (S. 1033) dienen; außerdem sind noch folgende Verfahren vorgeschlagen:

**αα) Verfahren mit m-Nitrobenzhydrazid nach J. HANUŠ<sup>12</sup>.** Die bis 0,15 g Vanillin in 50 ccm enthaltende wäßrige Lösung wird in einem ERLENMEYER-Kolben mit 0,2 g m-Nitrobenzhydrazid, gelöst in 10 ccm heißem Wasser, versetzt. Den verschlossenen Kolben läßt man unter öfterem Schütteln 24 Stunden — bis der Geruch nach Vanillin verschwunden ist — stehen, filtriert alsdann durch einen bei 100° getrockneten GOOCH-Tiegel mit Asbestfilter den Niederschlag ab, wäscht mit kaltem Wasser aus, bis das Waschwasser keine Reaktion mit ammoniakalischer Silberlösung mehr zeigt, und trocknet 2 Stunden im Lufttrockenschranke bei 100—105°.

<sup>1</sup> F. X. MOERK: Amer. Journ. Pharmac. **63**, 572; Zeitschr. analyt. Chem. 1893, **32**, 242.

<sup>2</sup> KAHN: Amer. Druggist 1908, 5; MERCK'S Reagenzien-Verzeichnis 1929, 298. — Vgl. auch H. HERISSEY u. P. DELAUNEY: Journ. Pharm. et Chim. 1923, [7] **28**, 257; C. 1924, I, 221.

<sup>3</sup> C. ESTES: Journ. Ind. Engin. Chem. 1917, **9**, 142; C. 1920, IV, 239. — Vgl. auch K. KREIS u. J. SRUDINGER (Mitt. Lebensm.-Unters. u. Hygiene 1927, **18**, 333) über NICKEL'S Reagens.

<sup>4</sup> J. GRÜSS: Ber. Deutsch. Botan. Ges. 1921, **38**, 361; C. 1921, II, 978.

<sup>5</sup> J. H. KASTLE: Publ. Health and Marine Hospital Service U.S.A. Bull. **26** **31**; C. 1906, I, 1575.

<sup>6</sup> BONNEMA: Pharm. Weekbl. 1897, Nr. 24; MERCK'S Reagenzien-Verzeichnis 1929, 62.

<sup>7</sup> H. BEHRENS: Chem.-Ztg. 1902, **26**, 1125.

<sup>8</sup> EMICH: Mikrochemie 1926, 242.

<sup>9</sup> C. GRIEBEL: Mikrochemie 1931, **9**, 315; C. 1931, II, 3233.

<sup>10</sup> M. WAGENNAAR: Mikrochemie 1932, **11**, 135; Pharm. Weekbl. 1932, **69**, 190; C. 1932, II, 3751.

<sup>11</sup> Nach L. G. RADCLIFFE u. E. H. GHARPLES (Perfumery essent. Oil Record 1925, **16**, 51; C. 1925, I, 2119) gibt das Verfahren zu niedrige Werte.

<sup>12</sup> J. HANUŠ: Z. 1905, **10**, 585. — Vgl. auch Z. 1900, **3**, 531 u. 1903, **6**, 817.

Vanillin-m-nitrobenzhydrazin  $\left( \text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{l} \text{NH} \cdot \text{N} : \text{CH} \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \\ \text{NO}_2 \end{array} \begin{array}{l} \text{O} \cdot \text{CH}_3 \\ \text{OH} \end{array} \right) \times 0,4829 = \text{Vanillin}.$

Bei stärker verdünnten Lösungen (100—200 ccm) erfordert die Reaktion längere Zeit, bis der Geruch nach Vanillin verschwunden ist.

Neben anderen Aldehyden ist die Bestimmung nicht brauchbar; dagegen stören Benzoesäure, Salicylsäure, Cumarin und Zucker die Bestimmung nicht.

$\beta\beta$ ) Colorimetrische Bestimmung. Nach C. ESTES kann dessen Farb-reaktion auf Vanillin (S. 1051) auch zur colorimetrischen Bestimmung dienen: Es werden 5 ccm einer etwa 1%igen Vanillinlösung mit 0,5 ccm seines Reagens 10 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt, und die erhaltene Farblösung auf die Farbtiefe einer gleich behandelten Probe eingestellt.

In gleicher Weise kann nach TH. v. FELLEBERG<sup>1</sup> Vanillin colorimetrisch nach der Farb-reaktion von MOERK bestimmt werden; die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei etwa 0,01 mg.

O. FOLIN und W. DENIS<sup>2</sup> beschreiben eine colorimetrische Bestimmung mit phosphorsaurer Phosphorwolframsäure-Phosphormolybdänsäurelösung.

$\gamma\gamma$ ) Prüfung von Vanillinpräparaten auf Reinheit. Diese kann nach S. B. PHILLIPS<sup>3</sup> außer durch die Bestimmung der Methoxygruppe nach ZEISEL (S. 988) auf maß- und gewichtsanalytischem Wege erfolgen:

1. Maßanalytisches Verfahren (Bestimmung der OH-Gruppe<sup>4</sup>): Etwa 1 g Vanillin wird in einem 250—300 ccm-Kolben mit 20 ccm 80%igem neutralem Alkohol<sup>5</sup> und darauf mit 1,1—1,2 g p-Toluidin versetzt. Nach der Lösung gibt man 20 ccm 0,5 N.-Natronlauge und darauf 100 ccm kohlenstoffsaure Wasser hinzu und kühlt auf 15—17° ab. Wenn die Lösung klar bleibt, titriert man den Alkaliüberschuß mit 0,5 N.-Schwefelsäure zurück, indem man diese solange zusetzt, bis ein Tropfen eine dauernde Trübung verursacht<sup>6</sup>. 1 ccm 0,5 N.-Lauge = 0,076 g Vanillin.

Entsteht auf den Wasserzusatz ein Niederschlag, so deutet dies auf die Gegenwart eines Aldehyds ohne phenolische OH-Gruppe, wie Piperonal. In diesem Falle ist das Verfahren nicht anwendbar und muß die Bestimmung gewichtsanalytisch nach  $\delta\delta$ ) erfolgen. Bis 10% Benzoesäure stören das maßanalytische Verfahren nicht; bei höherem Gehalt muß ebenfalls das gewichtsanalytische Verfahren angewendet werden.

2. Gewichtsanalytisches Verfahren bei Abwesenheit von Piperonal (und anderen Aldehyden). 1 g Vanillin wird in einem 100 ccm-Becherglase mit 13,6 ccm 0,5 N.-Natronlauge unter Schütteln auf einem Wasserbade leicht erwärmt und dabei gelöst. In einem gleichen Becherglase werden 2,4 g Semicarbazid-hydrochlorid und 5 g kryst. Natriumacetat in 30 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst. Diese Lösung wird filtriert und zu der Vanillinlösung gegeben und nach dem Umrühren 10 Minuten im kochenden Wasserbade erhitzt. Nach der Abkühlung läßt man die Lösung zur Abscheidung des Semicarbazids 4 Stunden in der Kälte stehen. Darauf filtriert man den Niederschlag durch ein gewogenes Filter ab und wäscht mit kaltem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit Silbernitrat aus; Filtrat und Waschwasser sollen nicht über 200 ccm betragen. Filter mit Niederschlag werden 3—4 Stunden bzw. bis zur Gewichtskonstanz im Wassertrockenschrank getrocknet und dann gewogen. Vanillin-semicarbazon  $\times 0,7271 = \text{Vanillin}.$

$\delta\delta$ ) Bestimmung von Vanillin neben Piperonal<sup>7</sup>. Zu dieser Bestimmung können bei Abwesenheit anderer Aldehyde folgende Verfahren dienen:

<sup>1</sup> TH. VON FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1922, **13**, 98. — Vgl. auch W. S. HUBBARD: Journ. Ind. Engin. Chem. 1912, **4**, 669; **Z.** 1913, **26**, 297.

<sup>2</sup> O. FOLIN u. W. DENIS: Journ. Ind. Engin. Chem. 1912, **4**, 670; **Z.** 1913, **26**, 298.

<sup>3</sup> S. B. PHILLIPS: Analyst 1923, **48**, 367.

<sup>4</sup> P. WELMANS (Pharm. Ztg. 1889, **34**, 634) titriert die Lösung unmittelbar unter Verwendung von Phenolphthalein als Indicator. — Vgl. auch L. G. RADCLIFFE u. E. H. SHARPLES: Perfumery essent. Oil Record 1924, **15**, 396; **C.** 1925, **1**, 1460.

<sup>5</sup> Der Alkohol muß natürlich frei von Aldehyden und Ketonen sein und unter Verwendung von Methylrot neutralisiert sein.

<sup>6</sup> Nach O. PFUNDT u. C. JUNGE (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, **62**, 515) wird die Titration besser konduktometrisch ausgeführt.

<sup>7</sup> Vgl. auch die Kritik der vorgeschlagenen Methoden durch L. G. RADCLIFFE u. E. H. SHARPLES: Perfumery essent. Oil Record 1924, **15**, 396 u. 1926, **16**, 20f.; **C.** 1925, **1**, 1460, 2119 u. II, 1816.

1. Nach J. HANUŠ<sup>1</sup> mit Platinchlorid. Die 0,02—0,15 g Vanillin enthaltende wäßrige Lösung wird in einem ERLÉNMEYER-Kolben mit 10 ccm 10%iger (salpetersäurefreier) Platinchloridlösung versetzt und auf 50 ccm — bei größerem Volumen der Lösung und mehr Vanillin auf 100 ccm — mit Wasser aufgefüllt. Darauf stellt man den Kolben 1 Stunde in einen Wassertrockenschrank von 70—80° und läßt darauf 1 Stunde lang völlig abkühlen. Das in grauen oder graubraunen Nadeln abgeschiedene Kondensationsprodukt des Vanillins wird in einem GOOCH-Tiegel mit Asbestfilter abfiltriert, gründlich mit kaltem Wasser ausgewaschen, bis zur Gewichtskonstanz bei 100—105° getrocknet und gewogen.

Da nicht alles Vanillin ausgeschieden wird, sind die Mengenverhältnisse und die Behandlung genau innezuhalten und ist der Vanillingehalt ( $x$ ) aus der Menge des Kondensationsproduktes ( $y$ ) nach folgenden Formeln zu berechnen:

$$\text{Bei 50 ccm: } x = \frac{y + 15,7}{0,97}, \quad \text{bei 100 ccm: } x = \frac{y + 38,25}{1,04}.$$

2. Nach S. B. PHILLIPS<sup>2</sup> mit Semicarbazid. Das nach  $\gamma\gamma$  2 dargestellte und gewogene Semicarbazon wird in einem Becherglase mit 60 ccm Wasser und 40 ccm Ammoniak ( $D = 0,880$ ) auf etwa 50° erwärmt und unter Rühren gelöst. Das Vanillin-semicarbazon löst sich mit gelber Farbe. Nach der Abkühlung wird das Ungelöste durch ein gewogenes Filter abfiltriert und mit kaltem Wasser bis zum Verschwinden der Gelbfärbung gewaschen. Um festzustellen, ob alles Vanillin-semicarbazon ausgewaschen ist, wird noch einmal mit 1 + 2 verd. Ammoniak gewaschen, wobei keine Gelbfärbung des Filtrates eintreten darf. Nach dreistündigem Trocknen im Wassertrockenschranke wird der Rückstand gewogen; er wird von dem nach  $\gamma\gamma$  2 erhaltenen Semicarbazon in Abzug gebracht; die Differenz beider Bestimmungen ergibt durch Multiplikation mit 0,7271 das vorhandene Vanillin.

3. Sonstige Verfahren. Außer den vorstehenden Kondensationsprodukten ist noch eine weitere Reihe von solchen zur Bestimmung des Vanillins herangezogen worden, darunter von J. HANUŠ das p-Brom-phenylhydrazin<sup>3</sup>.

$\epsilon\epsilon$ ) FR. WOHACK<sup>4</sup> benutzt das Methoxyverfahren von ZEISEL (S. 988) zu einer Mikrobestimmung des Vanillins.

### b) Piperonal (Heliotropin).

Piperonal liefert mit Hydrazinen und anderen organischen Stoffen Kondensationsverbindungen, die unter anderem durch ihre Schmelzpunkte (S. 1024) gekennzeichnet sind, allerdings denen des Vanillins zum Teil nahe liegen.

$\alpha$ ) Nachweis. Nach C. B. GNADINGER<sup>5</sup> gibt Piperonal folgende Farbreaktionen: Versetzt man Piperonal mit einigen Körnchen Phloroglucin und 5 Tropfen konz. Salzsäure, so tritt bei Gegenwart von Piperonal eine Rotfärbung auf; Vanillin gibt eine ähnliche Reaktion.

Löst man etwas Piperonal in 1 ccm Alkohol und erhitzt 0,1 ccm der Lösung im Wasserbade 2 Minuten mit 0,1 ccm alkoholischer 20%iger Gallussäurelösung und 2 ccm konz. Schwefelsäure, so färbt sich die Flüssigkeit smaragdblau.

Zur Unterscheidung von Vanillin und Piperonal können folgende Reaktionen dienen:

| Reaktion mit   | Vanillin  | Piperonal                         |
|--|---|-----------------------------------|
| Ferrosulfat-Brom nach MOERK (S. 1051) und Ferrichlorid nach KAHN (S. 1051) | Grünblaue Färbung<br>Ausscheidung grauer Nadeln | Keine Färbung<br>und Ausscheidung |
| Eisessig + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nach HANUŠ <sup>6</sup> . . .    | Rotviolette Färbung                             | Grüne Färbung                     |
| p-Nitrodiazobenzol nach HANUŠ <sup>6</sup> . . .                           | Kirschrote Färbung                              | Keine Färbung                     |
| Platinchlorid nach HANUŠ <sup>6</sup> . . . . .                            | Ausscheidung grauer bis<br>brauner Nadeln       | Keine Ausscheidung                |
| p-Toluidin nach PHILLIPS (S. 1052) . .                                     | Keine Ausscheidung                              | Ausscheidung eines<br>Kondensats  |

<sup>1</sup> J. HANUŠ: Z. 1900, 3, 657.

<sup>2</sup> S. B. PHILLIPS: Analyst 1923, 48, 367.

<sup>3</sup> J. HANUŠ: Z. 1900, 3, 531.

<sup>4</sup> FR. WOHACK: Z. 1921, 42, 290.

<sup>5</sup> C. B. GNADINGER: Ind. Engin. Chem. 1926, 18, 588; C. 1926, II, 838.

<sup>6</sup> HANUŠ: Z. 1900, 3, 357.

Für den mikrochemischen Nachweis haben H. BEHRENS<sup>1</sup>, EMICH<sup>2</sup>, C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>3</sup> sowie M. WAGENAAR<sup>4</sup> eine Reihe von Verfahren beschrieben, auf die hier verwiesen sei.

**β) Bestimmung.** Wenn in einer Lösung außer Piperonal keine anderen Aldehyde und keine Ketone vorhanden sind, so können nach L. G. RADCLIFFE und E. H. SHARPLES<sup>5</sup> zur Bestimmung des Piperonals die Verfahren mit Phenylhydrazin (S. 1032), mit Hydroxylamin und Jod nach V. MEYER und mit Semioxamazid<sup>6</sup> und als Diacetat dienen; hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Bestimmungen zum Teil auf präparativen Methoden beruhen. Das Verfahren von M. RIPPER (S. 1032) soll zu niedrige Werte geben.

## 5. Sonstige Aldehyde.

### a) Zimtaldehyd.

Zimtaldehyd,  $C_6H_5 \cdot CH : CH \cdot CHO$ , ist ein charakteristisch riechendes farbloses Öl, dem der Zimt seinen Geruch verdankt. Siedepunkt 250—252° unter teilweiser Zersetzung; Erstarrungspunkt —7,5°. Er ist in Äther und Alkohol leicht löslich, dagegen in 66 Tln. 70%igem Alkohol nicht mehr klar löslich; in Wasser ist er unlöslich und in Petroläther fast unlöslich. Spez. Gew. (15°): 1,054—1,058. An der Luft oxydiert sich Zimtaldehyd zu Zimtsäure, während er durch Kaliumpermanganat zu Benzaldehyd und Benzoesäure oxydiert wird.

**α) Nachweis.** Zimtaldehyd liefert mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen Kondensationsprodukte, die unter anderem durch ihre Schmelzpunkte (S. 1024) gekennzeichnet sind. Über den mikrochemischen Nachweis s. BEHRENS-KLEY, Organische mikrochemische Analyse 1922, S. 75.

**β) Bestimmung.** In Lösungen, die außer Zimtaldehyd keine anderen Aldehyde und keine Ketone enthalten, kann der Zimtaldehyd nach den Verfahren von RIPPER (S. 1032), FEINBERG (S. 1033), LAUTENSCHLÄGER (S. 1032) und BENNETT (S. 1034) bestimmt werden, außerdem nach dem

Verfahren von J. HANUŠ<sup>7</sup>. Etwa 0,1 g Zimtaldehyd oder eine entsprechende Menge Zimtöl werden in einem ERLÉNMEYER-Kolben mit 100 ccm Wasser durch Schütteln gleichmäßig emulgiert, mit der 1 $\frac{1}{2}$ -fachen Menge Semioxamazid in heißer wäßriger Lösung versetzt und die Mischung in dem verschlossenen Kolben kräftig geschüttelt. Nach kurzer Zeit wird die Mischung trüber und bei weiterem Schütteln ballen sich kleine Flocken des Azons zusammen. Nach 24 Stunden, während welcher zeitweise geschüttelt wird, wird die Ausscheidung durch einen GOOCH-Tiegel mit Asbestfilter abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Der Tiegel wird darauf 4—5 Stunden bzw. bis zur Gewichtskonstanz bei 105° getrocknet und gewogen. Semioxamazon  $\times$  0,6083 = Zimtaldehyd.

### b) Salicylaldehyd.

Salicylaldehyd (o-Oxybenzaldehyd),  $OH \cdot C_6H_4 \cdot CHO$ , ist ein gewürzig riechendes Öl. Siedepunkt 197°; Erstarrungspunkt —20°; Spez. Gew. (15°): 1,1530. Der Aldehyd ist mit Alkohol und Äther in jedem Verhältnis mischbar, dagegen

<sup>1</sup> H. BEHRENS: Chem.-Ztg. 1902, **26**, 1125.

<sup>2</sup> EMICH: Mikrochemie 1926, **2**.

<sup>3</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Mikrochemie 1927, **5**, 168.

<sup>4</sup> M. WAGENAAR: Mikrochemie 1932, **11**, 135.

<sup>5</sup> L. G. RADCLIFFE u. E. H. SHARPLES: Perfumery essent. Oil Record 1925, **16**, 20f.; C. 1925, **II**, 1816.

<sup>6</sup> Vgl. auch W. KERP u. K. UNGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 585 u. G. TIERIE: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1933, **52**, 357.

<sup>7</sup> J. HANUŠ: Z. 1903, **6**, 817. Hier finden sich auch die näheren Angaben über die Darstellung des Oxamazids nach W. KERP und K. UNGER (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 588).

nur wenig löslich in Wasser; ferner ist er im Gegensatz zum m- und p-Aldehyd mit Wasserdämpfen flüchtig. Durch Oxydation mit Chromsäure entsteht Salicylsäure.

$\alpha$ ) **Nachweis.** Salicylaldehyd liefert mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen Kondensationsprodukte, die unter anderem durch ihre Schmelzpunkte (S. 1024) gekennzeichnet sind. Über den mikrochemischen Nachweis s. BEHRENS KLEY: Organische mikrochemische Analyse 1922, S. 77. Außerdem können zum Nachweis folgende Farbenreaktionen dienen:

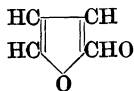
1. Die wäßrige Lösung gibt mit Eisenchlorid starke Violettfröbung.
2. Beim Schütteln von 25—30 Tropfen einer alkoholischen 1%igen Lösung von Salicylaldehyd mit 10 ccm fuselöhhaltigem Alkohol und 20 ccm konz. Schwefelsäure entsteht eine nach dem Erkalten granatrote Fröbung (A. KOMAROWSKI<sup>1</sup>).
3. Salicylaldehyd gibt die v. BIRROSCHE Reaktion mit Nitroprussidnatrium (S. 1030) nicht.

$\beta$ ) **Bestimmung.** In Lösungen, die außer Salicylaldehyd keine anderen Aldehyde und keine Ketone enthalten, kann der Salicylaldehyd nach den Verfahren von FEINBERG (S. 1033) und, da er gegen Phenolphthalein als einbasische Säure reagiert, auch durch Alkalititration — besser durch Leitfähigkeitstitration<sup>2</sup> — bestimmt werden.

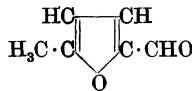
### c) Furanaldehyde.

(Furfurol, Methylfurfurol, Oxy-methylfurfurol.)

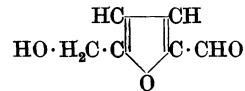
Furfurol (Furol, Furanaldehyd),  $C_5H_4O_2$ , ist eine leichtflüchtige farblose, sich an der Luft schnell bräunende Flüssigkeit vom Siedepunkt 161—161,5<sup>0</sup> und dem Spez. Gew. ( $\frac{20^0}{4^0}$ ) 1,1594. Es löst sich in 11 Tln. Wasser (13<sup>0</sup>) und ist in Äther und Alkohol leicht löslich. Furfurol entsteht bei der Destillation von Kohlenhydraten, insbesondere von Pentosanen, mit Salz- und Schwefelsäure (S. 928).



Furfurol



Methylfurfurol



Oxy-methylfurfurol

Methylfurfurol,  $C_6H_6O_2$ , ist ein leichtflüchtiges, farbloses Öl vom Siedepunkt 186,5—187<sup>0</sup> und dem Spez. Gew. (18<sup>0</sup>) 1,1087. Es löst sich in 30 Tln. Wasser. Methylfurfurol entsteht bei der Destillation von Methylpentosanen mit Salz- und Schwefelsäure (S. 934).

Oxy-methylfurfurol (Furolocarbinol),  $C_6H_6O_3$ , ist ein leichtflüchtiges, farbloses, sich an der Luft bräunendes Öl vom Siedepunkt (0,02 mm) 72<sup>0</sup> und dem Spez. Gew. ( $\frac{23^0}{4^0}$ ) 1,1022. Es löst sich in 25 Tln. Wasser. Oxy-methylfurfurol entsteht namentlich beim Erhitzen von Fructose und solche enthaltenden Zuckern (Saccharose) (S. 852).

#### $\alpha$ ) Nachweis der Furanaldehyde.

Die Furanaldehyde geben mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen Kondensationsprodukte, die unter anderem durch ihre Schmelzpunkte (S. 1024) gekennzeichnet sind:

<sup>1</sup> A. KOMAROWSKI: Chem.-Ztg. 1903, 27, 807.

<sup>2</sup> A. THIEL u. H. ROEMER: Zeitschr. physikal. Chem. 1908, 63, 711.



| Kondensationsverbindung                            | Furfurol | Methylfurfurol | Oxy-methylfurfurol |
|--|----------|----------------|--------------------|
| Phenylhydrazon . . . . .                           | 97—98°   | 147—148°       | 140°               |
| p-Nitrophenylhydrazon . . . . .                    | 137°     | 130°           | 185°               |
| Semicarbazon . . . . .                             | 197°     | 210—211°       | —                  |
| Semioxamazon . . . . .                             | 264°     | —              | 216°               |
| Dimethylbarbitursäure (1,3) <sup>1</sup> . . . . . | 195—196° | 172—172,5°     | 181—182°           |

## Farbenreaktionen.

Die Furanaldehyde geben eine Reihe von charakteristischen Farbenreaktionen, die sich durch spektroskopische Prüfung zum Teil noch eindeutiger gestalten lassen. Die wichtigsten dieser Reaktionen sind folgende:

1. SCHIFFSche Reaktion<sup>2</sup>. Furfurol gibt mit einer Lösung von gleichen Volumen Xylidin und Eisessig — auch von Anilin und Eisessig — Rotfärbung; Empfindlichkeitsgrenze 0,5  $\gamma$ . Man kann auch mit Anilinacetat getränktes Papier mit der Furfurolösung betupfen oder dem Furfurol dampf aussetzen.

Methylfurfurol und Oxymethylfurfurol geben Gelbfärbung, die bei ersterem auf Zusatz von Salzsäure in Rot und bei letzterem von selbst später in Orange übergeht.

2. Ein mit Salzsäure angefeuchteter Fichtenspan wird durch Furfurol dampf grün.

3. Beim Schütteln von 5 ccm Sesamöl mit 1 Tropfen eines der 3 Furanaldehyde und 10 ccm rauchender Salzsäure färbt sich letztere stark rot. Vgl. S. 1049.

4. Eine Lösung von Benzidin in Eisessig, ebenso damit getränktes Papier, gibt mit Furfurol Violettfärbung (P. N. VAN ECK<sup>3</sup>).

5. Phloroglucin-Salzsäure gibt mit Furfurol einen dunkelgrünen, in heißem Alkohol unlöslichen, Methylfurfurol einen roten, darin löslichen Niederschlag (VOTOČEK<sup>4</sup>). Oxymethylfurfurol gibt einen dunkelbraunen Niederschlag (S. 929).

6. Gibt man nach S. AKABORI<sup>5</sup> zu 2—3 ccm der Furfuraldehydlösung einige mg Barbitursäure, erwärmt einige Minuten auf dem siedenden Wasserbade und schüttelt nach dem Abkühlen mit einigen Tropfen frisch destilliertem Anilin, so zeigt dieses selbst bzw.

nach dem Ansäuern mit einem Überschuss an Essigsäure, also mit Anilinacetat, nebenstehende Färbungen.

7. Resorcin-Salzsäure (1,19) gibt mit den 3 Furanaldehyden Rotfärbung (L. ROSENTHALER<sup>6</sup>).

8. Versetzt man 5 ccm der zu prüfenden Lösung mit 5 ccm Salzsäure und 0,02 g Orcin und erhitzt langsam zum Sieden, so bildet sich bei Anwesenheit von Furfurol eine bläulichgrüne Färbung, die beim Schütteln mit Amylalkohol in diesen übergeht. Empfindlichkeit 1:600000 (E. JUSTIN-MUELLER<sup>7</sup>).

9. Proteine (Tryptophan) und konz. Salzsäure geben mit Furfurol eine schmutzigrote bis braune, mit Methylfurfurol eine rote bis purpurrote und mit Oxymethylfurfurol eine rote, später violette Färbung.

10. Weitere Reaktionen des Oxymethylfurfurols geben W. A. VAN EKENSTEIN und J. J. BLANKSMA<sup>8</sup> sowie E. ERDMANN<sup>9</sup> an.

11. Zum mikrochemischen Nachweis<sup>10</sup> des Furfurols dienen namentlich die Kondensationsreaktionen mit Phenylhydrazin und Semicarbazid sowie die Furfuramidbildung mit Ammoniak.

<sup>1</sup> S. AKABORI: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1933, **66**, 139.

<sup>2</sup> H. SCHIFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1887, **20**, 540.

<sup>3</sup> P. N. VAN ECK: Pharm. Weekbl. 1923, **60**, 1204; C. 1924, I, 434.

<sup>4</sup> E. VOTOČEK: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1897, **30**, 1195. — Vgl. auch K. OSHIMA u. B. TOLLENS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1901, **34**, 1425.

<sup>5</sup> S. AKABORI: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1933, **66**, 139.

<sup>6</sup> L. ROSENTHALER: Zeitschr. analyt. Chem. 1909, **48**, 165.

<sup>7</sup> E. JUSTIN-MUELLER: Journ. Pharm. et Chim. 1922, **24**, 334; C. 1922, II, 731.

<sup>8</sup> W. A. VAN EKENSTEIN u. J. J. BLANKSMA: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, **43**, 2355.

<sup>9</sup> E. ERDMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, **43**, 2391.

<sup>10</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, 1922, S. 71 u. EMICH: Mikrochemie 1926, 258.

### β) Bestimmung der Furanaldehyde.

Die Bestimmung des Furfurols und Methylfurfurols spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Pentosane und Methylpentosane in den Lebensmitteln, die bei der Destillation mit Salzsäure Furfurol bzw. Methylfurfurol liefern. Zuerst wurde hierbei zur Bestimmung des Furfurols nach dem Vorschlage von B. TOLLENS<sup>1</sup> Phenylhydrazin verwendet, dessen Kondensationsprodukt mit Furfurol bei 50° getrocknet und gewogen wurde. Heute dienen für den gleichen Zweck die Verfahren mit Phloroglucin (S. 929), mit Barbitursäure (S. 930) und mit Bromatlösung (S. 932), von denen das mit Phloroglucin auch zur Trennung von Furfurol und Methylfurfurol verwendet wird (S. 935). Ferner können zur Furfurolbestimmung dienen das Hydroxylamin-Verfahren nach BENNETT (S. 1934), das Semioxamazid-Verfahren nach HANUŠ (S. 1054) und das 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Verfahren.

Dinitrophenylhydrazin-Verfahren nach E. SIMON<sup>2</sup>: 5—50 ccm einer 1- bzw. 0,1%igen Furfurollösung werden mit einer Lösung von 0,1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 12 ccm 2 N.-Salzsäure versetzt. Es scheidet sich das in Wasser unlösliche Furfurol-2,4-dinitrophenylhydrazon ab, das nach einstündigem Stehen im Eisschrank durch einen Glasfilter-Tiegel abgesaugt, mit verd. Salzsäure, darauf mit Wasser ausgewaschen und bei 110—115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird. — Ein colorimetrisches Verfahren mit diesem Reagens in alkalischer Lösung (Rotfärbung) zur Bestimmung der Furanaldehyde hat L. BARTA<sup>3</sup> angegeben.

Brom-Verfahren. Dieses von C. KULLGREN und H. TYDÉN herrührende Verfahren (S. 932) wird nach S. SASAKI<sup>4</sup>, wie folgt, ausgeführt: Eine Lösung von 5—18 mg Furfurol in 100 ccm 6%iger Salzsäure wird mit 5 ccm 2%iger Kaliumbromidlösung und 10 ccm 0,1 N.-Kaliumbromatlösung versetzt und verschlossen 2 Stunden im Thermostaten bei 20° stehen gelassen. Dann gibt man 10 ccm Kaliumjodidlösung hinzu und titriert das Jod mit 0,02 N.-Thiosulfatlösung. 1 mg Furfurol verbraucht bei 20° 2,122 ccm der 0,02 N.-Thiosulfatlösung; bei höherer Temperatur verbraucht Furfurol mehr Brom.

Zur Bestimmung kleiner Mengen Furfurol haben P. FLEURY und G. POIROT<sup>5</sup> ein colorimetrisches Verfahren mit Orcin vorgeschlagen, ferner L. M. TOLMAN<sup>6</sup> und L. BARTA<sup>3</sup> ein solches mit Anilin und Salzsäure bzw. Eisessig in alkoholischer Lösung.

Zur Bestimmung von Furfurol und Methylfurfurol nebeneinander können das Phloroglucin-Verfahren (S. 935) und nach S. SCHMIDT-NIELSEN und L. HAMMER<sup>7</sup> auch das Barbitursäure-Verfahren dienen. Man bestimmt zunächst die Summe beider Aldehyde und löst dann aus der Fällung die Methylfurfurol-Verbindungen mit Alkohol heraus.

Bestimmung von Oxy-methylfurfurol. In Lösungen, welche nur diesen Aldehyd<sup>8</sup> und keine Ketone enthalten, kann die Bestimmung in folgender Weise erfolgen:

1. Phloroglucin-Verfahren. Die Bestimmung erfolgt wie die des Furfurols (S. 928); die Menge des Phloroglucids ist ebenso wie beim Furfurol von den Bedingungen der Fällung und Trocknung abhängig (E. TROJE<sup>9</sup>).

Nach J. FIEHE<sup>10</sup> entsprechen bei Anwendung von 5 ccm Aldehydlösung, 5 ccm 32%iger Salzsäure und 40 ccm Phloroglucinlösung (6,25 g diresorcinfreies Phloroglucin in 1000 ccm 16%iger Salzsäure gelöst), Abfiltrieren nach 24 Stunden, Auswaschen mit 20 ccm Wasser, 3 Stunden Trocknen bei 100°, dann 3 Stunden Stehen an der Luft und Wägen die Phloroglucidmengen den folgenden Oxy-methylfurfurolmengen:

|                              |     |     |     |     |     |     |     |    |    |      |         |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|------|---------|
| Phloroglucid . . . . .       | 2   | 4   | 5   | 7,5 | 10  | 15  | 20  | 25 | 30 | 34   | 36 mg   |
| Oxy-methylfurfurol . . . . . | 2,3 | 3,3 | 4,2 | 5,0 | 5,9 | 7,9 | 9,9 | 12 | 14 | 15,8 | 16,3 mg |

<sup>1</sup> B. TOLLENS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1891, **24**, 3580.

<sup>2</sup> E. SIMON: Biochem. Zeitschr. 1932, **247**, 171.

<sup>3</sup> L. BARTA: Biochem. Zeitschr. 1934, **274**, 212.

<sup>4</sup> S. SASAKI: Bull. agric. chem. Soc. 1930, **6**, 42; C. 1931, I, 3378.

<sup>5</sup> P. FLEURY u. G. POIROT: Journ. Pharm. et Chim. 1922, [7] **26**, 87; C. 1923, II, 382.

<sup>6</sup> L. M. TOLMAN: Journ. Amer. Chem. Soc. 1906, **28**, 1619; C. 1907, I, 192.

<sup>7</sup> S. SCHMIDT-NIELSEN u. L. HAMMER: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1925, **75**, 635.

<sup>8</sup> Auch Glucose und Fructose dürfen nicht vorhanden sein.

<sup>9</sup> E. TROJE: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1925, **75**, 635.

<sup>10</sup> J. FIEHE: Z. 1931, **62**, 381. — Vgl. auch Z. 1929, **58**, 69.

2. p-Nitrobenzhydrazid-Verfahren nach F. WEISS<sup>1</sup>. 20 ccm der wäßrigen Aldehydlösung werden unter Umschwenken mit 5 ccm gesättigter p-Nitrobenzhydrazid-lösung in 30%iger Essigsäure versetzt; die ausgeschiedenen citronengelben Kryställchen werden nach einigen Stunden durch einen Porzellanfiltertiegel abfiltriert, reichlich mit Wasser nachgewaschen und 2—3 Stunden bei 105° getrocknet. Hydrazone  $\times 0,435 =$  Oxy-methylfurfuröl. 1 mg Aldehyd ergibt noch deutlich wahrnehmbare Krystalle.

3. Jodometrisches Verfahren nach E. TROJE<sup>2</sup>. Die Aldehydlösung wird mit soviel 0,1 N.-Jodlösung versetzt, daß die in einem Vorversuch ermittelte Jodmenge die dreifache der Aldehydmenge beträgt; dann wird mit soviel konz. Natronlauge versetzt, daß bei einem Volumen von 100 ccm die Lösung 0,5 normal ist. Das Reaktionsgemisch wird bei 20° 2 Stunden stehen gelassen, dann mit 25 ccm 3 N.-Schwefelsäure angesäuert und das unverbrauchte Jod sofort mit Thiosulfatlösung zurücktitriert. Gleichzeitig ist ein Leerversuch ohne Aldehyd anzustellen. Die Differenz ist der Jodverbrauch des Aldehyds. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 6,8 mg Oxy-methylfurfuröl.

4. Colorimetrisches Verfahren mit Resorcin-Salzsäure. E. TROJE<sup>2</sup> empfiehlt dieses Verfahren zur Bestimmung kleiner Mengen Oxy-methylfurfuröl. Es ist brauchbar, weil die Farbstärke der Menge des Aldehyds proportional ist. Die Färbungen werden verglichen mit Standardlösungen von Carbofuchsin.

### III. Nachweis und Bestimmung von Ketonen.

Die Ketone sind Verbindungen von der allgemeinen Formel  $R \cdot CO \cdot R$  (einfache Ketone) oder  $R \cdot CO \cdot R'$  (gemischte Ketone), die in vielen Eigenschaften und Reaktionen den Aldehyden ähnlich sind, sich aber wesentlich durch ihr Verhalten bei der Oxydation von ihnen unterscheiden (S. 1023).

Die Ketone bilden in gleicher Weise wie die Aldehyde mit Hydrazinen und anderen Verbindungen Additions- und Kondensationsprodukte (S. 1024); auch die Farbenreaktionen verhalten sich vielfach ähnlich.

Im nachfolgenden sollen nur das einfache Monoketon Aceton und das einfache Diketon Diacetyl behandelt werden.

#### 1. Aceton.

Aceton (Dimethylketon),  $C_3H_6O = CH_3 \cdot CO \cdot CH_3$ , ist eine farblose, leicht bewegliche, flüchtige, leicht entzündbare, neutrale Flüssigkeit von eigenartigem Geruch und brennendem Geschmack, die bei 56,3° siedet; Spez. Gewicht ( $\frac{0^\circ}{4^\circ}$ ) 0,8125. Aceton ist mit Wasser, Alkohol, Äther und Chloroform in jedem Verhältnis mischbar; aus der wäßrigen Lösung wird es durch Calciumchlorid und Kaliumcarbonat ausgesalzen. Durch Chromsäure und Permanganat wird Aceton zu Ameisen- und Essigsäure oxydiert, durch Permanganat in alkalischer Lösung auch zu Oxalsäure.

Das Deutsche Arzneibuch VI stellt an Aceton unter anderen folgende Anforderungen:

Dichte 0,790—0,793. Aceton darf Lackmuspapier nicht röten und muß sich im gleichen Raumteil Wasser klar lösen. — Werden 10 ccm Aceton nach dem Verdünnen mit 10 ccm Wasser in einem Glasstöpselzylinder mit 2 ccm ammoniakalischer Silberlösung versetzt, so darf die Flüssigkeit beim Stehen im Dunkeln innerhalb  $\frac{1}{2}$  Stunde höchstens eine schwach bräunliche Färbung annehmen (Aldehyde). — Versetzt man 10 ccm Aceton mit 1 Tropfen Kaliumpermanganatlösung, so darf die Rotfärbung innerhalb  $\frac{1}{4}$  Stunde nicht vollständig verschwinden (Fremde organische Stoffe). — Wird die Lösung von 1 ccm Aceton in 5 ccm Wasser in einem weiten Probierrohr mit 2,5 ccm Kaliumpermanganatlösung (1+49) und 0,2 ccm Schwefelsäure gemischt, nach 3 Minuten mit 0,5 ccm gesättigter Oxalsäurelösung geschüttelt und sodann mit 1 ccm Schwefelsäure und 5 ccm SCHIFFS Reagens versetzt, so darf innerhalb 3 Stunden keine Blau- oder Violettfärbung eintreten (Methylalkohol). — Wird eine Mischung von 20 ccm Aceton, 30 ccm Wasser und 10 ccm N.-Kalilauge 1 Stunde lang am Rückflußkühler erhitzt und hierauf nach Zusatz von Phenolphthaleinlösung mit

<sup>1</sup> F. WEISS: Z. 1929, 58, 320. Dasselbst auch Angaben über die Darstellung des Reagens.

<sup>2</sup> E. TROJE: Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1925, 75, 635.

N.-Salzsäure bis zum Verschwinden der Rotfärbung titriert, so müssen hierzu 10 ccm verbraucht werden (Ester). — 10 ccm Aceton dürfen nach dem Verdampfen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

### a) Nachweis von Aceton.

Liegen für den Nachweis keine reinen wäßrigen oder alkoholischen Lösungen vor, so destilliert man das Aceton mit Wasserdampf ab und verwendet für den Nachweis das Destillat. Aceton liefert mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen Kondensationsprodukte (S. 1024), die unter anderem durch ihre Schmelzpunkte (S. 1024) gekennzeichnet sind.

Aceton reduziert im Gegensatz zu den Aldehyden (S. 1024) alkalische Metallsalzlösungen (Silber, Kupfer, Quecksilber) nicht.

Zum Nachweis von Aceton können einige Fällungsreaktionen und eine große Zahl von Farbenreaktionen<sup>1</sup> dienen; von letzteren sind einige für Aceton eindeutig, andere hat es mit Aldehyden gemeinsam.

Die wichtigsten Acetonreaktionen sind folgende:

#### α) Fällungsreaktionen.

αα) Jodoform-Reaktion. Aceton gibt ebenso wie Äthylalkohol und Acetaldehyd die Jodoform-Reaktion nach LIEBEN (S. 1007)<sup>2</sup>. Zur Unterscheidung des Acetons von letzteren verfährt man zweckmäßig nach der abgeänderten Methode von GUNNING<sup>3</sup>: Statt Jod und Natronlauge verwendet man eine Lösung von Jod in Ammoniumjodid und Ammoniak. Man setzt so viel Jod-Ammoniumjodidlösung zu der mit Ammoniak alkalisch gemachten Lösung, bis der anfangs entstehende schwarze Niederschlag von Jodstickstoff nicht mehr sofort verschwindet. Bei Anwesenheit von Aceton entsteht an Stelle des schwarzen Niederschlags mehr oder weniger rasch eine weiße milchige Trübung, die sich schließlich unter Ausscheidung von krystallinischem Jodoform klärt. Empfindlichkeit 0,01 mg in 1—3 Minuten, 0,0001 mg bei 24stündigem Stehen in 1 ccm Flüssigkeit.

Nach J. VAN DER LEE<sup>4</sup> ist die Konzentration der H<sup>+</sup>-Ionen von ausschlaggebender Bedeutung für die Bildung des Jodoforms, und zwar tritt sie bei Aceton bei kleinerem p<sub>H</sub> ein als bei Äthylalkohol. Werden z. B. 10 ccm einer Pufferlösung vom p<sub>H</sub>-Wert 9 mit 10 Tropfen Jod-Kaliumjodidlösung und 6 Tropfen im Verhältnis 1+3 verdünnten Acetons oder Alkohols versetzt, dann bildet sich mit Aceton ein Niederschlag, während beim Alkohol noch kein Jodoformgeruch wahrzunehmen ist. Beim Zutropfen von 25 Tropfen Jod-Kaliumjodidlösung und 15 Tropfen Aceton oder Alkohol (1+3) zu 10 ccm einer Pufferlösung mit dem p<sub>H</sub>-Wert 10 entsteht mit Aceton ein Niederschlag, während beim Alkohol nur der Geruch nach Jodoform wahrzunehmen ist.

ββ) Mercurisulfat-Reaktion nach G. DENIGÈS<sup>5</sup>. Man erhitzt die nicht mehr als 0,1%ige Acetonlösung mit dem gleichen Volumen Reagens (5 g gelbes Mercurioxyd in 20 ccm konz. Schwefelsäure + 100 ccm Wasser gelöst und nach 24 Stunden filtriert) 10 Minuten im siedenden Wasserbade. Bei Gegenwart von Aceton, von dem noch 2 mg in 100 ccm Wasser nachweisbar sind, bildet sich ein weißer krystalliner, in Salzsäure löslicher Niederschlag (Zusammensetzung s. S. 1016), aus dessen wäßriger Suspension das Aceton durch Schwefelwasserstoff wieder abgeschieden werden kann.

<sup>1</sup> Die Mehrzahl der Farbenreaktionen ist zum Nachweis von Aceton im Harn ausgearbeitet. Vgl. die kritische Prüfung dieser Reaktionen durch P. BOHRISCH (Pharm. Zentralh. 1907, 48, 181f.).

<sup>2</sup> Vgl. dazu auch I. M. KORENMAN: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 93, 335.

<sup>3</sup> BARDY: Journ. Pharm. et Chim. 1881, 4, 30; Zeitschr. analyt. Chem. 1885, 24, 147.

<sup>4</sup> J. VAN DER LEE: Chem. Weekbl. 1926, 23, 444; Zeitschr. analyt. Chem. 1932, 89, 368.

<sup>5</sup> G. DENIGÈS: Compt. rend. Paris 1898, 126, 1868 u. 127, 963; C. 1898, II, 420 u. 1899, I, 233.

Methylalkoholische Lösungen müssen mit Wasser auf 10°, äthylalkoholische auf 2° Alkohol verdünnt werden, weil sonst bei ersteren Mercurisulfat und bei letzteren Mercurosulfat sich abscheidet.

Die Reaktion ist für Aceton gegenüber Aldehyden eindeutig; sie tritt aber auch mit Acetessigsäure ein, aus der sich mit Säuren Aceton abspaltet, ferner mit Diäthylketon und mit Methyläthylketon beim Abkühlen.

Über die Reaktion mit dem SCOTT-WILSONSchen Reagens (alkalische Mercuricyanid- und Silbernitratlösung) siehe S. 1086.

γγ) Wasserstoffsperoxyd-Reaktion nach A. BAEYER und V. VILLIGER<sup>1</sup>. Setzt man zu 1 ccm einer eisgekühlten Mischung von Wasserstoffsperoxyd und konz. Schwefelsäure 1 Tropfen wäßriger Acetonlösung, so entsteht sofort ein krystalliner, leichtflüchtiger Niederschlag von Acetonsperoxyd (Schmelzpunkt 132—133°; explosiv).

δδ) Mikrochemischer Nachweis. H. BEHRENS<sup>2</sup> verwendet die Jodoform-Reaktion, C. GRIEBEL<sup>3</sup> die Reaktion mit m-Nitrophenylhydrazin, C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>4</sup> die Reaktion mit p-Nitrophenylhydrazin.

### β) Farbenreaktionen.

#### αα) Für Aceton eindeutige Reaktionen.

1. Reaktion nach V. FROMMER und EMILEWICZ<sup>5</sup>. 10 ccm der zu prüfenden Lösung werden mit 1 g festem Kalihydrat und, ohne dessen Lösung abzuwarten, mit 8—10 Tropfen einer alkoholischen 10%igen Salicylaldehydlösung versetzt und auf 70° erhitzt. Bei Gegenwart von Aceton zeigt das Kalihydrat eine purpurrote Umgebung. Ist das Kalihydrat in Lösung gegangen, so zeigt diese zuerst eine gelbe, dann rötliche, später purpurrote und nach längerem Stehen eine carmoisinrote Färbung. Die Reaktion beruht auf der Bildung von Di-oxybenzol-aceton und fällt noch in 0,01%iger wäßriger Lösung positiv aus.

K. TÄUFEL und H. THALER<sup>6</sup> haben eine für Ketone eindeutige Farbreaktion mit Salicylaldehyd und konz. Schwefelsäure angegeben, die namentlich für den Nachweis höherer aliphatischer Ketone geeignet ist, da diese damit himbeerrote Farbtöne liefern, während mit Aceton eine Orangefärbung eintritt.

2. Reaktion mit Hydroxylamin nach O. PILOTY und A. STOCK<sup>7</sup>. Man versetzt die zu prüfende, möglichst neutrale Lösung in einem Reagensglase mit je 1 Tropfen 10%iger Hydroxylaminchlorhydratlösung und 5%iger Natronlauge, gibt einen größeren Tropfen Pyridin hinzu, überschichtet mit einer dünnen Ätherschicht und fügt langsam unter Umschütteln so lange Bromwasser hinzu, bis der Äther sich deutlich gelb oder grün gefärbt hat. Darauf fügt man 1 ccm Wasserstoffsperoxydlösung hinzu und schüttelt um. Bei Gegenwart von Aceton (oder einem anderen Keton) färbt sich der Äther infolge Bildung von Brom-nitroso-aceton  $\left( (\text{CH}_3)_2 \cdot \text{C} \begin{array}{l} \text{NO} \\ \text{Br} \end{array} \right)$  blau. Es sind noch 0,02% Aceton nachweisbar; 50% Alkohol in der Lösung stören die Reaktion nicht.

3. Vanillin-Reaktion nach M. KUTSCHEROFF<sup>8</sup>. Als Reagens verwendet man eine Lösung von 15 g Vanillin in 100 ccm Alkohol. Zu 3 ccm der zu untersuchenden Lösung setzt man 2 ccm des Reagens und fügt dann 1 ccm konz. Schwefelsäure hinzu. Bei hohem Gehalt an Aceton (1—0,1%) tritt sofort carminrote Färbung auf, bei 0,1—0,01% jedoch erst nach Verlauf einiger Zeit. Beobachtung nach 10—15 Minuten. Auf Zusatz von Wasser verschwindet die carminrote Farbe und geht in Citronengelb über (Gegensatz zu anderen Ketonen). Bei Zusatz von Kali- oder Natronlauge zu den durch Wasser verdünnten Lösungen bis zur alkalischen Reaktion nimmt die gelbgefärbte Acetonlösung eine intensiv orangenrote Färbung an, während die Lösungen der übrigen Ketone entfärbt werden.

Die Reaktion ist namentlich zur Erkennung von Aceton neben anderen Ketonen (Methyläthyl-, -propyl-, -butyl-keton) in mit Ketonöl denaturierten Alkohol geeignet. Da Acetaldehyd in größeren Mengen störend wirkt, muß er gegebenenfalls durch Destillation vor der Anstellung der Reaktion entfernt werden.

<sup>1</sup> A. BAEYER u. V. VILLIGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, **32**, 3625 u. 1900, **33**, 124.

<sup>2</sup> H. BEHRENS: Chem.-Ztg. 1902, **26**, 1125.

<sup>3</sup> C. GRIEBEL: Z. 1924, **47**, 438.

<sup>4</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Mikrochemie 1927, **5**, 159.

<sup>5</sup> V. FROMMER u. EMILEWICZ: Berl. klin. Wochenschr. 1905, **42**, 1008; Pharm. Zentralh. 1907, **48**, 210; Apoth.-Ztg. 1905, **20**, 629.

<sup>6</sup> K. TÄUFEL u. H. THALER: Chem.-Ztg. 1932, **56**, 265.

<sup>7</sup> O. PILOTY u. A. STOCK: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, **35**, 3093.

<sup>8</sup> M. KUTSCHEROFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1905, **44**, 622.

4. LEGALSche Reaktion. Diese bei Harnuntersuchungen viel angewendete Reaktion soll in der Ausführung mit Ammoniak und primären Aminen (S. 1046) für Aceton eindeutig sein.

5. Sonstige Reaktionen. Reaktion mit Furfurol (W. ELLRAM<sup>1</sup>), mit Kupfersulfat und Jod-Kaliumjodid (M. STERNBERG<sup>2</sup>) und mit Bromwasser (G. DENIGÈS<sup>3</sup>).

### ββ) Reaktionen, die außer mit Aceton auch mit Acetaldehyd und anderen Aldehyden eintreten.

Diese Reaktionen werden vielfach als Keton- oder Aceton-Reaktionen bezeichnet, obschon sie auch mit Acetaldehyd und anderen Aldehyden eintreten, weil sie vorwiegend zum Nachweis von Aceton im diabetischen Harn dienen, in dem Aldehyde im allgemeinen nicht auftreten.

1. Nitroprussidnatrium-Reaktion (vgl. S. 1046). Diese zuerst von LEGAL<sup>4</sup> zum Nachweis von Aceton im Harn empfohlene Reaktion wird nach ihm, wie folgt, ausgeführt: Man versetzt die zu untersuchende Lösung mit einer frisch bereiteten alkalischen Lösung von Nitroprussidnatrium. Bei Anwesenheit von Aceton entsteht eine rote Färbung; diese Farbe geht bald in Gelb über. Setzt man dann überschüssige Essigsäure zu, so entsteht eine carminrote Färbung, welche im Laufe von 1—2 Tagen durch Violett in Blau übergeht.

P. BOHRISCH<sup>5</sup> hat die Ausführung der Reaktion, wie folgt, schärfer gefaßt: Man gibt zu 5 ccm der zu prüfenden Lösung 5 Tropfen 10%ige Nitroprussidnatriumlösung und hierauf 1 ccm 15%ige Natronlauge. Entsteht dabei eine rote oder rotgelbe Färbung, so wird sofort mit Essigsäure neutralisiert, worauf bei Gegenwart von viel Aceton eine rotviolette, bei mäßigem Acetongehalt eine weinrote und bei wenig Aceton eine rosaviolette Färbung eintritt.

Die LEGALSche Probe hat zahlreiche Abänderungen erfahren, so von LE NOBEL<sup>6</sup>, der Ammoniak und Ammoniumcarbonat verwendet, von A. C. H. ROTHERA<sup>7</sup>, der Ammoniumsalz und Ammoniak, von F. A. FAUGHT<sup>8</sup> und H. I. SCHÄFFER<sup>9</sup>, die Äthylendiaminhydrat zusetzen. F. LANGE<sup>10</sup> führt sie als Ringreaktion aus. Vgl. ferner B. v. BITTÓ (S. 1030) und E. RIMINI (S. 1046); letzterer beschreibt eine Reaktion mit Nitroprussidnatrium und primären Aminen, die nur mit Aceton eintreten soll; das gleiche soll bei der Abänderung von LE NOBEL der Fall sein.

2. Hydroxylamin-Reaktion nach FRÖHNER<sup>11</sup>. In 5 ccm der zu untersuchenden Lösung löst man einen Krystall Hydroxylaminchlorhydrat, versetzt die Lösung mit Chlorkalklösung und schüttelt mit wenig Äther; dieser wird noch blau gefärbt, wenn in der Lösung 10 mg Aceton vorhanden sind. Die Reaktion tritt auch mit Acetaldehyd ein, im Gegensatz zu der Ausführungsform von PILOTY und STOCK (S. 1060).

3. Quecksilberoxyd-Reaktion nach REYNOLDS-GUNNING<sup>12</sup>. Die Reaktion beruht auf der Eigenschaft des Acetons, bei Gegenwart von Alkali Quecksilberoxyd, besonders frisch gefälltes, zu lösen. Man versetzt eine Lösung von Quecksilberchlorid mit alkoholischer Kalilauge, fügt die zu untersuchende Flüssigkeit hinzu und schüttelt stark. Das klare Filtrat prüft man auf Quecksilber durch vorsichtiges Schichten mit Schwefelammonium. — „Aldehyd“ löst nach E. SPAETH<sup>13</sup> ebenfalls Quecksilberoxyd.

4. Indigo-Reaktion nach PENTZOLDT<sup>14</sup>. Die Reaktion beruht auf der Indigosynthese mit o-Nitrobenzaldehyd nach A. v. BAYER und DREWSEN<sup>15</sup>. Sie wird nach P. BOHRISCH<sup>16</sup> am besten in der Weise ausgeführt, daß man einige Krystalle von o-Nitrobenzaldehyd

<sup>1</sup> W. ELLRAM: Chem.-Ztg. 1899, **23**, Rep. 171.

<sup>2</sup> M. STERNBERG: Zentralbl. Physiol. 1901, **25**, 69; C. 1901, I, 1270.

<sup>3</sup> G. DENIGÈS: Rep. de Pharm. 1910, **51**. — L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen, S. 157. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

<sup>4</sup> LEGAL: Zeitschr. analyt. Chem. 1883, **22**, 264.

<sup>5</sup> P. BOHRISCH: Pharm. Zentralh. 1907, **48**, 206.

<sup>6</sup> LE NOBEL: Nederl. Tijdschr. Geneeskunde 1883; Zeitschr. analyt. Chem. 1885, **24**, 146.

<sup>7</sup> A. C. H. ROTHERA: Journ. Physiol. 1908, **37**, 491; C. 1909, I, 402. Vgl. auch W. VAN URK: Pharm. Weekbl. 1925, **62**, 8; C. 1925, I, 964.

<sup>8</sup> F. A. FAUGHT: Essentials of Labory Diagnosis. Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 369.

<sup>9</sup> H. I. SCHÄFFER: Amer. Journ. Pharmac. 1926, **98**, 643; Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 369.

<sup>10</sup> F. LANGE: Münch. med. Wochenschr. 1906, Nr. 36; Pharm. Zentralh. 1907, **48**, 207.

<sup>11</sup> FRÖHNER: Deutsch. med. Wochenschr. 1901, **79**; Pharm. Zentralh. 1901, **42**, 567.

<sup>12</sup> REYNOLDS-GUNNING: Weekbl. Pharmacie 1883; Zeitschr. analyt. Chem. 1885, **24**, 148.

<sup>13</sup> E. SPAETH: Pharm. Zentralh. 1907, **48**, 184.

<sup>14</sup> PENTZOLDT: Arch. klin. Med. 1883, **34**, 132.

<sup>15</sup> A. v. BAYER u. DREWSEN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1882, **15**, 2860.

<sup>16</sup> P. BOHRISCH: Pharm. Zentralh. 1907, **48**, 208, 220.

in etwa 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit unter Schütteln bei 50° löst und nach dem Erkalten 1 ccm 15%ige Natronlauge hinzugibt. Bei Gegenwart von Aceton färbt sich das Gemisch zuerst goldgelb, dann grün und blau. Bei geringen Mengen Aceton tritt keine Blaufärbung ein; in diesem Falle schüttelt man die Flüssigkeit mit Chloroform aus, das sich blau färbt. — Nach R. RAW<sup>1</sup> ist die Reaktion empfindlicher, wenn man das Alkali erst in der zweiten Stufe der Reaktion zusetzt, indem man die zu prüfende Lösung mit etwa 3 Volumen acetonfreiem Methyl- oder Äthylalkohol etwa 1 Minute mit einigen Krystallen von o-Nitrobenzaldehyd kocht, die Lösung in ein gleiches Volumen 10%iger Natronlauge gießt und nochmals auf 80—90° erwärmt. Auch bei Gegenwart nur geringer Mengen von Aceton tritt sofort ein Niederschlag von Indigo auf. Empfindlichkeit: 1,6 mg Aceton. Die Reaktion ist nach RAW für Aceton eindeutig, während sie nach anderen Angaben<sup>2</sup> auch mit Acetaldehyd eintritt. — Vgl. die entsprechende Reaktion auf Benzaldehyd (S. 1048).

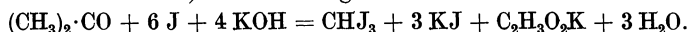
5. Sonstige Reaktionen. Reaktion mit m-Dinitrobenzol von B. v. BITTÓ<sup>3</sup>, mit Vanillin-Salzsäure (L. ROSENTHALER<sup>4</sup>).

6. Mikrochemischer Nachweis. Nach H. BEHRENS<sup>5</sup> verwendet man die Indigo-bildung mit o-Nitrobenzaldehyd.

### b) Bestimmung des Acetons.

Liegen für die Bestimmung keine reinen wäßrigen oder alkoholischen Lösungen vor, so destilliert man das Aceton mit Wasserdampf ab und verwendet für die Bestimmung das Destillat. Die nachfolgenden Bestimmungen können nur bei Lösungen angewendet werden, die keine die Bestimmung störenden Verbindungen (Alkohole, Aldehyde usw.) enthalten.

#### α) Bestimmung als Jodoform.



Die Jodoform-Reaktion nach LIEBEN ist von KRÄMER zu einer gewichts-analytischen und von MESSINGER zu einer titrimetrischen Methode ausgearbeitet worden; das Verfahren von MESSINGER verdient den Vorzug. L. F. KEBLER<sup>6</sup> schlägt eine Abänderung des Verfahrens von E. R. SQUIBB<sup>7</sup> bzw. von F. ROBINEAU und G. ROLLIN<sup>8</sup> vor, bei der das Jod, im Gegensatz zu den Verfahren von KRÄMER und MESSINGER, durch eine Lösung von Natriumhypochlorit erzeugt wird. Hierbei soll Äthylalkohol nicht störend wirken.

αα) Verfahren nach KRÄMER<sup>9</sup> in der Ausführung von KLARFELD<sup>10</sup>. Die abgewogene Substanz wird in einem Eudiometerrohr mit eingeschliffenem Stöpsel mit wenig reinem Methylalkohol, dann mit einem großen Überschuß an Jod und tropfenweise bis zur Entfärbung mit Kalilauge versetzt. Hierauf wird das Gemisch mit Wasser verdünnt und mit soviel Äther tüchtig durchgeschüttelt, daß die Ätherschicht nach dem Absitzen 10 ccm beträgt. 5 ccm der Ätherschicht werden in eine tarierte Schale pipettiert und nach dem Verdunsten des Äthers das Jodoform nach dreistündigem Stehen über Schwefelsäure gewogen. Das Verfahren liefert bei Bestimmung kleiner Acetonmengen etwas zu niedrige Werte.

<sup>1</sup> R. RAW: Journ. Soc. chem. Ind. 1932, 51, T 276; C. 1932, II, 2343.

<sup>2</sup> H. MEYER: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen, S. 62. Berlin: Julius Springer 1933.

<sup>3</sup> B. v. BITTÓ: Ann. Chem. 1892, 267, 372.

<sup>4</sup> L. ROSENTHALER: Zeitschr. analyt. Chem. 1905, 44, 292. — Vgl. auch die Angabe von L. ROSENTHALER in seinem „Nachweis organischer Verbindungen“ (Stuttgart: Ferdinand Enke 1914), S. 156, daß Acetaldehyd eine ähnliche Färbung gibt.

<sup>5</sup> H. BEHRENS: Chem.-Ztg. 1902, 26, 1125.

<sup>6</sup> L. F. KEBLER: Amer. Journ. Pharmac. 69, 65; Zeitschr. analyt. Chem. 1910, 49, 453.

<sup>7</sup> E. R. SQUIBB: Journ. Amer. Chem. Soc. 1896, 18, 1068; Zeitschr. analyt. Chem. 1898, 37, 696.

<sup>8</sup> F. ROBINEAU u. G. ROLLIN: Moniteur scient. 7, 272; Zeitschr. analyt. Chem. 1894, 33, 87.

<sup>9</sup> KRÄMER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1880, 13, 1000.

<sup>10</sup> KLARFELD: Monatsh. Chem. 1905, 26, 87.

$\beta\beta$ ) Verfahren nach MESSINGER<sup>1</sup>. Man bringt 20 ccm — bei größeren Acetonmengen 30 ccm — 5%ige Kalilauge und 1—2 ccm der Acetonlösung in eine Stöpselflasche und schüttelt um. Dann läßt man etwa 20—30 ccm 0,2 N.-Jodlösung zutropfen, schüttelt  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Minute, bis die über dem ausgefallenen Jodoform stehende Lösung klar erscheint, säuert mit Salzsäure (1,025) an, läßt 0,1 N.-Thiosulfatlösung im Überschuß zu, versetzt mit Stärkelösung und titriert mit Jodlösung zurück. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,967 mg Aceton.

Die Acetonlösung darf nach W. HINTZ<sup>2</sup> höchstens 1,5% Aceton enthalten; es empfiehlt sich stets ein gleichseitiger Leerversuch. Die Fehlergrenze beträgt nach K. LESNIČENKO<sup>3</sup>  $\pm 0,5\%$ ; meist sind die gefundenen Werte etwas zu hoch.

$\gamma\gamma$ ) J. M. AULD<sup>4</sup> führt in ähnlicher Weise das Aceton in Bromoform über.

### $\beta$ ) Mercurimetrische Bestimmung nach G. DENIGÈS<sup>5</sup>.

25 ccm der nicht mehr als 0,1%igen Acetonlösung werden mit 25 ccm des Quecksilberreagens (S. 1059) in einem Druckfläschchen 10 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt. Der weiße krystalline Niederschlag wird nach C. OPPENHEIMER<sup>6</sup> mittels GOOCH-Tiegels mit Asbestfilter abfiltriert, gründlich mit kaltem Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion des Filtrates und dann mit Alkohol und Äther ausgewaschen und bei 105—115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Niederschlag  $\times 0,055 =$  Aceton<sup>7</sup>.

A. MEYER und S. MATHEY<sup>8</sup> fällen in enger Anlehnung an DENIGÈS das Aceton mit überschüssiger Mercurisulfatlösung aus. Durch Bestimmung des Quecksilbers in der ursprünglichen Lösung und im Filtrat vom unlöslichen Aceton-Quecksilberniederschlag durch Titration mit 0,1 N.-Kaliumrhodanidlösung in Gegenwart von Eisenammoniakalaun als Indicator nach VOLHARD wird das an das Aceton gebundene Quecksilber ermittelt. Aus der bekannten Menge des Niederschlages berechnet man die Menge des Acetons. Differenz der Titrationswerte  $\times 0,28$  ergibt die Menge Aceton in g/l.

A. L. JONESCO-MATIU<sup>9</sup> hat ein weiteres Verfahren beschrieben, bei dem der Mercuriaceton-Niederschlag mit konz. Salpetersäure und konz. Schwefelsäure gelöst und nach Zusatz von Nitroprussidnatrium mit 0,1 N.-Natriumchloridlösung titriert wird.

### $\gamma$ ) Sonstige Verfahren.

Zur Bestimmung von Aceton können auch die allgemeinen Methoden zur Bestimmung von Aldehyden und Ketonen dienen, insbesondere folgende:

$\alpha\alpha$ ) Hydroxylamin-Verfahren. Über die Grundlagen des Verfahrens und die Ausführung der Bestimmung s. S. 1033<sup>10</sup>. 1 ccm 0,1 N.-Natronlauge = 5,8 mg Aceton. Methyl- und Äthylalkohol stören die Bestimmung nicht.

$\beta\beta$ ) Phenylhydrazin-Verfahren nach ARDAGH und WILLIAMS (S. 1033). Das Verfahren ist bis 0,1% genau.

<sup>1</sup> MESSINGER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1888, **21**, 3366.

<sup>2</sup> W. HINTZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1888, **27**, 183.

<sup>3</sup> K. LESNIČENKO: Chemicky Obzor 1932, **7**, 2—4; C. 1932, I, 2743.

<sup>4</sup> J. M. AULD: Journ. Soc. chem. Ind. 1906, **25**, 100; Zeitschr. analyt. Chem. 1907, **46**, 536.

<sup>5</sup> G. DENIGÈS: Compt. rend. Paris 1898, **127**, 963; C. 1899, I, 233.

<sup>6</sup> C. OPPENHEIMER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, **32**, 986 u. Berl. klin. Wochenschr. 1899, **36**, 828; C. 1899, II, 888.

<sup>7</sup> Der Niederschlag hat nach OPPENHEIMER die wahrscheinliche Zusammensetzung  $5 \text{ HgSO}_4 \cdot 7 \text{ HgO} \cdot 3 \text{ CO}(\text{CH}_3)_2$  (theoretischer Faktor 0,055), während DENIGÈS für den lange bei 110° getrockneten Niederschlag für die Zusammensetzung  $2 \text{ HgSO}_4 \cdot 3 \text{ HgO} \cdot \text{CO}(\text{CH}_3)_2$  den Faktor 0,06 angibt, der zu hoch ist.

<sup>8</sup> A. MEYER u. S. MATHEY: Compt. rend. Paris 1930, **191**, 490; Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 371.

<sup>9</sup> A. L. JONESCO-MATIU: Ann. scient. Univ. Jassy 1927, **14**, 363; Zeitschr. analyt. Chem. 1927, **72**, 430.

<sup>10</sup> Siehe ferner die Anwendung des Verfahrens von G. REIF (Z. 1921, **42**, 80) bei denaturiertem Alkohol und von M. KRAJČINOVIC (Chem.-Ztg. 1931, **55**, 894) bei technischen Lösungsmitteln.



$\gamma\gamma$ ) Bisulfit-Verfahren (S. 1032) nach A. JOLLES<sup>1</sup>. Das Verfahren soll nach W. STEPP und W. ENGELHARDT<sup>2</sup> brauchbare Werte liefern, wenn die Reaktionszeit genügend ausgedehnt wird — nach JOLLES 30—40 Stunden — und der Titer der Bisulfitlösung stets kontrolliert wird.

$\delta\delta$ ) Colorimetrische Bestimmung nach C. A. ADAMS und J. R. NICHOLLS<sup>3</sup>. Das Verfahren beruht auf der Überführung des Acetons in Indigo (S. 1061). Ein Teil der zu untersuchenden Lösung, der nicht mehr als 20 mg Aceton enthalten soll, wird mit Wasser auf 10 ccm verdünnt und mit 1 ccm einer frisch bereiteten 1%igen Lösung von o-Nitrobenzaldehyd in 50%igem Methylalkohol und 0,5 ccm 30%iger Natronlauge versetzt. Nach 15 Minuten hat die auftretende gelbgrüne bis grünblaue Farbe ihr Maximum erreicht; sie wird mit einer Reihe in derselben Weise aus Aceton hergestellter Standardlösungen verglichen.

Weitere colorimetrische Verfahren sind für die Bestimmung des Acetons im Harn vorgeschlagen, so von A. ADLER<sup>4</sup> und M. WAGENAAR<sup>5</sup> mit Nitroprussidnatrium und von FR. A. CSONKA<sup>6</sup> sowie C. URBACH<sup>7</sup> mit Salicylaldehyd auf Grund der FROMMERSCHEN Reaktion (S. 1060), auf die hier nur verwiesen werden kann.

## 2. Diacetyl.

Diacetyl (Dimethyl-glyoxal,  $\alpha$ -Diketo-butan),  $C_4H_6O_2 = CH_3 \cdot CO \cdot CO \cdot CH_3$ , ist eine grüngelbe, stechend riechende, flüchtige Flüssigkeit, deren Dampf die Farbe des Chlors besitzt. Schmelzpunkt:  $-2,4^\circ$ ; Siedepunkt:  $87,5-88^\circ$ ; Spez. Gewicht ( $22^\circ$ ): 0,9734. Diacetyl löst sich in etwa 4 Tln. Wasser ( $15^\circ$ ) und ist mit Alkohol und Äther in jedem Verhältnis mischbar. Diacetyl ist der Hauptträger des Butterduftes und des Caramelgeruches; es entsteht als Stoffwechselprodukt gewisser Milchsäurebakterien und allgemein beim Erhitzen von Kohlenhydraten<sup>8, 9</sup>, dabei wahrscheinlich durch Luftoxydation aus dem das Diacetyl stets begleitenden Methyl-acetyl-carbinol (Dimethyl-ketol, Acetoin),  $C_4H_8O_2 = CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot CH_3$  gebildet; umgekehrt kann letzteres durch Reduktion (mit Zink und Schwefelsäure) wieder in Diacetyl übergeführt werden<sup>10</sup>. Methyl-acetyl-carbinol ist im reinen Zustande geruchlos<sup>9</sup>; es siedet bei  $140-142^\circ$ , ist mit Wasserdämpfen flüchtig und reduziert FEHLINGSche Lösung in der Kälte. Es bildet sich unter anderem bei der alkoholischen Gärung acetaldehydhaltiger Zuckerlösungen<sup>11</sup> sowie bei der Essigsäuregärung<sup>12</sup> von Wein und Obstwein.

### a) Nachweis.

Diacetyl bildet wie andere Ketone Additions- bzw. Kondensationsprodukte mit Hydrazinen und anderen organischen Verbindungen, unter anderen folgende:

| Diacetyl-             | Schmelzpunkt          | Diacetyl-dioxim (Dimethyl-glyoxim),<br>$CH_3 \cdot C : N \cdot OH$ <sup>13</sup> , entsteht durch<br>$C_4H_8N_2O_2 = CH_3 \cdot C : N \cdot OH$ |
|-----------------------|-----------------------|---|
| Phenyl-hydrazon . . . | 133—134° (aus Benzol) | Einwirkung von Hydroxylamin-chlorhydrat auf Diacetyl; es ist für den Nachweis des   |
| Phenyl-osazon . . .   | 243° (aus Eisessig)   |   |
| Dihydrazon . . .      | 158° (aus Alkohol)    |   |

<sup>1</sup> A. JOLLES: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, **38**, 1306.

<sup>2</sup> W. STEPP u. W. ENGELHARDT: Biochem. Zeitschr. 1920, **111**, 8.

<sup>3</sup> C. A. ADAMS u. J. R. NICHOLLS: Analyst 1929, **54**, 2; Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 370.

<sup>4</sup> A. ADLER: Münch. med. Wochenschr. 1919, **66**, 722; C. 1919, IV, 398.

<sup>5</sup> M. WAGENAAR: Pharm. Weekbl. 1918, **55**, 57; C. 1918, I, 778.

<sup>6</sup> FR. A. CSONKA: Journ. Biol. Chem. 1916, **27**, 209; C. 1917, I, 975.

<sup>7</sup> C. URBACH: Biochem. Zeitschr. 1931, **236**, 164.

<sup>8</sup> H. SCHMALFUSS u. H. BARTHMEYER: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, **176**, 282; Biochem. Zeitschr. 1929, **216**, 330.

<sup>9</sup> C. B. VAN NIEL, A. J. KLUYVER u. H. G. DERYX: Biochem. Zeitschr. 1929, **210**, 234.

<sup>10</sup> O. DIELS u. E. STEPHAN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1907, **40**, 4336.

<sup>11</sup> C. NEUBERG u. E. REINFURTH: Biochem. Zeitschr. 1923, **143**, 553.

<sup>12</sup> K. FARNSTEINER: Z. 1899, **2**, 198; 1908, **15**, 321. — R. W. BALCOM: Journ. Amer. Chem. Soc. 1917, **39**, 309; C. 1918, I, 126.

<sup>13</sup> L. TSCHUGAEFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, **38**, 2520; Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1905, **46**, 144.

letzteren besonders geeignet, weil es mit Nickel die innerkomplexe Verbindung Nickel-diacetyl-dioximin<sup>1</sup> bildet, die aus hochroten, metallisch glänzenden Nadelchen besteht, die von 250° an, namentlich im luftverdünnten Raume, unzersetzt sublimieren. Aus der Nickelverbindung kann das Diacetyl-dioxim wieder gewonnen werden, indem man sie mit Kaliumcyanid einige Minuten auf dem Wasserbade erwärmt, wobei sich das Dioxim nach dem Ansäuern mit Essigsäure krystallinisch abscheidet und durch Umkrystallisieren aus Alkohol gereinigt werden kann. Der Schmelzpunkt des Diacetyl-dioxims liegt nach R. FITTIG, C. DAIMLER und H. KELLER<sup>2</sup> bei 234,5°<sup>3</sup>.

Nachweis von Diacetyl nach H. SCHMALFUSS und H. BARTHMEYER<sup>4</sup>. 1 ccm der zu untersuchenden wäßrigen Lösung wird mit 0,1 ccm wäßriger 20%iger Hydroxylamin-chlorhydratlösung, 0,05 ccm 1,25%iger Nickelsulfatlösung (NiSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) und tropfenweise 25%igem Ammoniak versetzt, bis die Lösung gerade basisch reagiert. Dann wird 1 Minute über freier Flamme gekocht und die noch basische Lösung schnell in fließendem Wasser gekühlt. Bei Gegenwart von Diacetyl scheiden sich scharlachrote Nadeln von Nickel-diacetyl-dioximin ab.

Aus dem Nickel-diacetyl-dioximin läßt sich das Diacetyl-dioxim leicht zurückgewinnen<sup>5</sup> und durch seinen Schmelzpunkt und den Mischschmelzpunkt mit reinem Diacetyl-dioxim (235°) auf Identität prüfen. Es wurde auch ein Mikroverfahren<sup>6</sup> ausgearbeitet, nach dem man noch 0,4 mg Nickel-acetyl-dioximin reinigen, in reines Dioxim überführen und auf seinen Schmelzpunkt untersuchen kann. Nach diesem Verfahren konnte in weniger als 1 ccm einer 0,002%igen Diacetylösung dieses nachgewiesen werden. In der Lösung etwa vorhandene Aldehyde müssen vor Anstellung der Reaktion, am besten mit Dimethon (S. 1027), entfernt werden.

Nachweis von Methyl-acetyl-carbinol nach M. LEMOIGNE<sup>7</sup>. Nachdem aus der zu untersuchenden Substanz das Diacetyl im Kohlendioxidstrome mit Wasserdampf abdestilliert ist, versetzt man den Rückstand mit 50 ccm 50%iger Ferrichloridlösung, welche das Methyl-acetyl-carbinol zu Diacetyl oxydiert, und destilliert darauf nach Zusatz von 500 ccm gesättigter Natriumchloridlösung bei 110°, später bei 150°<sup>8</sup>, 50 ccm Flüssigkeit unter guter Kühlung über; von diesen 50 ccm werden nach Sättigung mit Natriumchlorid in gleicher Weise 8 ccm überdestilliert und diese wie oben auf Diacetyl geprüft.

Methyl-acetyl-carbinol wird durch Nickelsalze nicht gefällt. Es reduziert FEHLINGSche Lösung (1 Tl. Kupfersulfat + 2 Tle. alkalischer Tartratlösung) in der Kälte<sup>9</sup>. Nach H. SCHMALFUSS und H. BARTHMEYER<sup>10</sup> sind durch Zugabe von 1 Tropfen FEHLINGScher Lösung auf 1 ccm Destillat in der Kälte 0,03% und beim Erwärmen noch 0,005% Methyl-acetyl-carbinol nachweisbar.

Eine Farbenreaktion (Rotfärbung) auf Methyl-acetyl-carbinol (Acetoin) gibt O'MEARA<sup>11</sup> an.

## b) Bestimmung.

Die Bestimmung des Diacetyls und des Methyl-acetyl-carbinols kann nach SCHMALFUSS und BARTHMEYER in der Weise erfolgen, daß man wie beim qualitativen Nachweis zunächst im Kohlendioxidstrome mit Wasserdampf das Diacetyl abdestilliert, dann durch Zusatz von Ferrichlorid zu dem Destillations-

<sup>1</sup> Die entsprechende Kupferverbindung bildet fast schwarze, glänzende Prismen, deren Lösung dunkelbraun ist.

<sup>2</sup> R. FITTIG, C. DAIMLER u. H. KELLER: Ann. Chem. 1888, **249**, 202.

<sup>3</sup> H. BILTZ (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1908, **41**, 1880) gibt dagegen den korrigierten Schmelzpunkt von 245—246° an.

<sup>4</sup> H. SCHMALFUSS u. H. BARTHMEYER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1927, **60**, 1035; Biochem. Zeitschr. 1929, **216**, 330; Z. 1932, **63**, 283.

<sup>5</sup> L. TSCHUGAEFF: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1905, **46**, 144.

<sup>6</sup> H. SCHMALFUSS u. H. BARTHMEYER: Mikrochemie 1932, **11**, 300.

<sup>7</sup> M. LEMOIGNE: Dissertation Paris 1913. — H. SCHMALFUSS u. H. BARTHMEYER: Z. 1932, **63**, 283.

<sup>8</sup> Methyl-acetyl-carbinol siedet bei 140—142°.

<sup>9</sup> K. FARNSTEINER: Z. 1899, **2**, 198; 1908, **15**, 321. — E. ARBENZ: Schweizer. Mitt. Lebensm.-Unters. u. Hygiene 1924, **15**, 52.

<sup>10</sup> H. SCHMALFUSS u. H. BARTHMEYER: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, **176**, 282.

<sup>11</sup> O'MEARA: Journ. pathol. Bacteriol. 1933, **34**, 401; C. 1933, **II**, 3018.

rückstände das Methyl-acetyl-carbinol zu Diacetyl oxydiert, dieses im Wasserdampfstrom wie oben abdestilliert und nun ebenfalls bestimmt. C. B. VAN NIEL<sup>1</sup> führt zwei Destillationen, die eine ohne, die andere mit Zusatz von Ferrichlorid aus; er erhält im ersteren Fall das genuine Diacetyl und im zweiten Falle die Summe des genuinen und des aus dem Methyl-acetyl-carbinol durch Oxydation entstandenen Diacetyls.

Bestimmung des Diacetyls nach C. B. VAN NIEL<sup>1</sup>. Die zu untersuchende Flüssigkeit, welche schwach sauer reagieren soll, wird langsam destilliert<sup>2</sup> und das Destillat aufgefangen in einer Mischung, welche für je 100 mg Diacetyl etwa 2 ccm 20%ige Hydroxylaminchlorhydrat-, 3—5 ccm 20%ige Natriumacetat-<sup>3</sup> und 1—2 ccm 10%ige Nickelchlorid-Lösung enthält. Wenn ungefähr  $\frac{3}{5}$  der ursprünglichen Flüssigkeit abdestilliert sind, wird das Kölbchen mit dem Destillat verschlossen und 1 Stunde lang in einem Wasserbade von 80° untergetaucht. Nach dem Abkühlen filtriert man den leicht filtrierbaren Niederschlag von Nickel durch ein Filter — sehr geeignet ist der Jenaer Glasfiltertiegel G 3<sup>5</sup>/<sub>7</sub> — und trocknet nach dem Auswaschen mit heißem Wasser bei 110°. Gewicht des Nickel-diacetyl-dioxims ( $a$ )  $\times 0,596 =$  Diacetyl.

Bestimmung des Methyl-acetyl-carbinols (+ Diacetyls). Man verfährt wie bei der Bestimmung des Diacetyls, nur wird vor der Destillation ein Überschuß von Ferrichlorid (50 ccm 20%ige Lösung) zugesetzt. Gewicht des Nickel-diacetyl-dioxims ( $b$ )  $\times 0,610 =$  Methyl-acetyl-carbinol.

Liegt ein Gemisch von Diacetyl und Methyl-acetyl-carbinol vor, wie es meistens der Fall ist, so beträgt der Gehalt an

$$\text{Diacetyl} = a \times 0,596 \text{ g}$$

$$\text{Methyl-acetyl-carbinol} (b - a) \times 0,610 \text{ g.}$$

#### IV. Nachweis und Bestimmung von Aldehyden, Aceton und Äthylalkohol nebeneinander.

Hierfür können unter anderen folgende Verfahren verwendet werden:

##### 1. Nachweis von Aldehyden und Ketonen nebeneinander.

Die wichtigsten analytischen Verfahren zur Unterscheidung von Aldehyden und Ketonen sind folgende:

a) Da die Aldehyde leicht und die einfachen Ketone schwer oxydiert werden, wirken die Aldehyde reduzierend auf ammoniakalische Silber- und alkalische Kupferlösung, die Ketone dagegen nicht.

b) Die Ketone geben im Gegensatz zu den Aldehyden bei der Reaktion nach DOEBNER (S. 1027) keine  $\beta$ -Naphtho-cinchoninsäuren und bei der Reaktion mit Nitro-hydroxylaminsäure (S. 1029) keine Hydroxamsäuren.

##### 2. Nachweis von Formaldehyd neben Hexamethylentetramin.

C. KOLLO und F. POLYCHRONIADE<sup>4</sup> haben ein mikrochemisches Verfahren hierfür beschrieben, das auf der Ausfällung des Hexamethylentetramins durch Pikrinsäure oder Wismutchlorid beruht und bei dem im Filtrat der Formaldehyd als Dimethon-Verbindung (S. 1027) nachgewiesen wird. Auf die Ausführung des Verfahrens muß hier verwiesen werden.

<sup>1</sup> C. B. VAN NIEL: Biochem. Zeitschr. 1927, 187, 472.

<sup>2</sup> Am besten, um Oxydation des Methyl-acetyl-carbinols zu verhindern, im Kohlendioxidstrom.

<sup>3</sup> Als Pufferlösung.

<sup>4</sup> C. KOLLO u. F. POLYCHRONIADE: Pharm. Zentralh. 1932, 73, 578.

L. ROSENTHALER<sup>1</sup> weist Formaldehyd neben Hexamethylentetramin durch die Farbenreaktion mit Phloroglucin (S. 1037) nach.

### 3. Nachweis von Formaldehyd und Acetaldehyd nebeneinander.

Zum Nachweis von Formaldehyd dienen die für diesen eindeutigen Reaktionen (S. 1035—1039) und zum Nachweis von Acetaldehyd die für diesen eindeutigen Reaktionen (S. 1045 und 1046).

### 4. Bestimmung von Formaldehyd und Acetaldehyd nebeneinander nach D. VORLÄNDER<sup>2</sup>.

Als Fällungsmittel der Aldehyde verwendet man Methon (S. 1027 und 1042). Das Gemisch der Methonverbindungen wird zur quantitativen Fällung gebracht, indem man 12 Stunden auf 50° erwärmt. Darauf schüttelt man Lösung und Niederschlag nach Zusatz von  $\frac{1}{15}$  des Volumens kalter 50%iger Schwefelsäure während 16—18 Stunden auf der Maschine. Der Niederschlag wird sodann abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und mit kalter Natriumcarbonatlösung (Spez. Gewicht 1,095) verrieben oder geschüttelt. In Natriumcarbonat löslich ist unverändertes, mit verdünnter Säure fällbares Formaldimethon, als Rückstand bleibt das gebildete, in Natriumcarbonatlösung unlösliche Anhydrid des Äthylidenmethons. Beide Methone werden gewaschen, getrocknet und gewogen. Entsprechend der geringen Löslichkeit der Formalverbindung in Wasser ergeben sich für Formaldehyd bessere Werte (97—99%), als für Acetaldehyd (91—93%).

### 5. Bestimmung von Formaldehyd und Aceton nebeneinander nach F. MACH und H. HERRMANN<sup>3</sup>.

Das Prinzip des Verfahrens ist folgendes: Bei der Jodmethode nach MES-SINGER (S. 1063) wird der Formaldehyd zu Ameisensäure oxydiert, während aus Aceton quantitativ Jodoform gebildet wird. Durch Ermittlung des durch Jodoform gebundenen Jods, wie auch durch Bestimmung des Jodoforms, kann aus dem durch diesen Befund festgestellten Jodgehalt durch Subtraktion von dem Gesamt-Jodverbrauch, der durch Rücktitration mit N.-Thiosulfatlösung gefunden ist, das zur Oxydation des Formaldehyds benötigte Jod errechnet werden.

Man pipettiert 25 ccm, entsprechend ungefähr 0,1500 g zu untersuchender Substanz, in einen gut verschließbaren Kolben, gibt 25 ccm N.-Lauge hinzu und läßt sofort unter Umschütteln 70 ccm 0,1 N.-Jodlösung (der Überschuß soll 50% betragen) zufließen. Nach 10 Minuten säuert man mit 26—27 ccm N.-Schwefelsäure an und titriert den Überschuß an Jod zurück; Stärke gibt man erst gegen Ende der Reaktion zu.

Hierauf destilliert man im Wasserdampfstrom unter Verwendung eines Kugelaufsatzes das gebildete Jodoform ab. Der Kühler ist mit einem Vorstoß versehen, den man am besten durch eine leicht abnehmbare Glasröhre (um die anhaftenden Jodoformkrystalle nach Beendigung der Destillation leichter lösen zu können) bis auf den Boden der Vorlage reichen läßt. Zum Auffangen benutzt man einen zweiten, gleich großen Destillationskolben, der auch später zum Umsetzen des Jodoforms zu Jodsilber dient. Der Vorlagekolben ist mit einem zweiten kleinen LIEBIGSchen Kühler abgeschlossen. Die Vorlage selbst steht während der ganzen Destillation in fließendem Wasser. Die Destillation wird so vorgenommen, daß erst beim Einleiten des Wasserdampfes der Destillationskolben

<sup>1</sup> L. ROSENTHALER: Pharm. Zentralh. 1932, 73, 737.

<sup>2</sup> D. VORLÄNDER: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, 77, 326.

<sup>3</sup> F. MACH u. R. HERRMANN: Zeitschr. analyt. Chem. 1923, 63, 422.

mit starker Flamme erhitzt wird (bei geringen Mengen Jodoform bedarf es dieser starken Erwärmung nicht). So lange das Jodoform noch nicht übergeht, muß häufig geschüttelt werden, um dessen Zusammenballen zu vermeiden. Nach 10 Minuten des Destillierens stellt man die Kühlung ab, um das im Kühlrohr verdichtete Jodoform durch die Erwärmung in die Vorlage zu treiben. Der Aufgangkolben ist stark zu kühlen und häufig umzuschütteln. Das Jodoform geht gewöhnlich innerhalb der ersten 5 Minuten vollkommen oder doch zum größten Teil über.

Zur Umsetzung des Jodoforms zu Jodsilber erhitzt man das Destillat mit 0,1 N.-Silbernitratlösung, 10—30 ccm Alkohol und 1—2 ccm konz. Salpetersäure in 100—200 ccm Wasser 30—90 Minuten lang unter öfterem Umschütteln auf dem Wasserbade am Rückflußkühler. Nach beendeter Reaktion filtriert man das entstandene Jodsilber ab, wäscht gut aus und titriert im Filtrat nach Abkühlung das überschüssige Silbernitrat mit 0,1 N.-Rhodankaliumlösung zurück. Als Indicator verwendet man 5 ccm 10%ige Eisenalaunlösung. Die Zugabe der Salpetersäure darf nicht vor der Silbernitratbeimischung erfolgen, da durch die Säure sonst eine Oxydation des Jods zu Jodat erfolgen könnte.

Während kleine Mengen Jodoform (bis zu 50 mg) schon nach 1 Stunde vollkommen umgesetzt sind, ist es ratsam, bei mehr als 50 mg die Reaktion auf 90 Minuten auszudehnen, wobei man während der letzten halben Stunde die Reaktionsflüssigkeit mit kleiner freier Flamme im Sieden erhält. Der Silbernitratüberschuß soll mindestens 200% des durch die Umsetzung verbrauchten Silbernitrates betragen; man erhält dann Werte, die ungefähr 98% der Substanz entsprechen.

#### Berechnung.

$a$  = Gesamtverbrauch an 0,1 N.-Jodlösung, durch Rücktitration mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung gefunden.

$b$  = Verbrauch von 0,1 N.-Silbernitratlösung. 1 ccm der Lösung entspricht 2 ccm 0,1 N.-Jodlösung, die zur Bildung von Jodoform durch Aceton verbraucht werden.

$x$  = Verbrauch von 0,1 N.-Jodlösung zur Oxydation von Formaldehyd =  $a - 2b$ .

1 ccm 0,1 N.-Jodlösung entspricht 1,50 mg Formaldehyd und 0,967 mg Aceton.

Bei einem Mischungsverhältnis von Aceton: Formaldehyd = 15:100 werden 93—94% des Acetons gefunden, bei höherem Acetongehalt wächst der Fehler. Bei 64% Acetongehalt, auf Formaldehyd berechnet, liegt der wahre Formaldehydwert 2—3% unter dem gefundenen. In solchen Fällen verwendet man bei gleichbleibenden Mischungsverhältnissen weniger Substanz zur Analyse.

## 6. Bestimmung von Acetaldehyd und Aceton nebeneinander.

a) Bestimmung des Acetaldehyds nach W. STEPP und R. FRICKE<sup>1</sup>. Acetaldehyd kann bei gleichzeitiger Anwesenheit von Aceton mit hinreichender Genauigkeit mit Hilfe der „Silbermethode“ bestimmt werden. Diese ist eine Ausgestaltung der TOLLENSschen Reaktion auf Aldehyde zu einer Bestimmungsmethode, und zwar einfach in der Art, daß der Aldehyd mit einem Überschuß einer genau bestimmten Menge ammoniakalischen Silberoxyds oxydiert und der Überschuß zurücktitriert wird.

Man versetzt die zu untersuchende Lösung mit einem nicht zu großen Überschuß von 0,1 N.-Silbernitratlösung, fügt etwas weniger als die dem Silbernitrat entsprechende Menge 0,1 N.-Natronlauge hinzu und gibt vorsichtig Ammoniak bis zur eben eintretenden Lösung des ausgefallenen Silberoxyds nach. Die erhaltene Lösung läßt man in zugekorkter Flasche im Dunkeln über Nacht stehen. Am anderen Tage überzeugt man sich, daß die Flüssigkeit mindestens  $1\frac{1}{2}$ —2 Finger breit hoch über dem Boden des betreffenden Kölbchens steht und füllt, wenn nötig, entweder das Fehlende mit Wasser nach oder spült die Flüssigkeit quantitativ in ein kleineres Kölbchen. Dann erhitzt man die Lösung vorsichtig

<sup>1</sup> W. STEPP u. R. FRICKE: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 116, 294; 1922, 118, 241.

am Rückflußkühler, bis die ersten aufsteigenden Bläschen den Eintritt des Siedens anzeigen, nimmt die Flamme für 5 Minuten weg und kocht danach noch 1 Minute. Nach dem Abkühlen versetzt man unter Umschwenken solange mit konz. Ammoniaklösung, bis die Flüssigkeit stark danach riecht. Darauf nutschte man durch mit Salzsäure ausgekochten und gut ausgewaschenen Asbest ab und wäscht dreimal mit stark ammoniakhaltigem Wasser nach. Das Filtrat wird dann mit nitritfreier Salpetersäure übersäuert, mit etwas Eisenammoniumalaunlösung (2—5 ccm einer 10%igen Lösung) versetzt und mit 0,1 N.-Ammoniumrhodanidlösung gegen die ursprünglich angewandte Menge Silbernitrat zurücktitriert. Jedem Kubikzentimeter verschwundener 0,1 N.-Silbernitratlösung entsprechen 2,2 mg Acetaldehyd.

War die Acetaldehydlösung zu verdünnt, so daß sich beim Reduktionsprozeß eine rote bis braune kolloidale Lösung von metallischem Silber bildete, so versucht man diese entweder durch nochmaliges kurzes Aufkochen zur Ausflockung zu bringen oder bereitet sich durch Destillation eine konzentriertere Aldehydlösung.

Will man Acetaldehyd und Aceton gleichzeitig nebeneinander bestimmen, so versetzt man die zu untersuchende Lösung mit einem Überschuß von 0,1 N.-Silberlösung und gibt soviel 0,1 N.-Natronlauge hinzu, daß das Silber nicht vollkommen ausgefällt wird. Ein Überschuß an Natronlauge ist zu vermeiden. Das Gemisch läßt man  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen (nicht länger!). Nach der vorgeschriebenen Zeit kocht man das Gemisch 8—10 Minuten lang am Rückflußkühler und destilliert darauf das Aceton in zwei eisgekühlte Vorlagen über. Am zweckmäßigsten verwendet man bei der Destillation zwei hintereinandergeschaltete Kühler, nämlich einen aufsteigenden Kugelhühler und einen daran angeschlossenen absteigenden Schlangenkühler, der in die Vorlage führt. Ersterer dient zunächst als Rückflußkühler und dann, indem man ihn einfach leerlaufen läßt, als Fraktionieraufsatz. Man destilliert etwa  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit über. Im Destillat kann das Aceton direkt nach MESSINGER (S. 1063) bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Acetaldehyds wird der Rückstand weiter verarbeitet, indem man nach Lösung des Silberoxyds in Ammoniak und Abfiltrieren vom reduzierten Silber in dem Filtrat das unverbrauchte Silber nach Übersäuerung wie oben titrimetrisch bestimmt. Die hierbei erhaltenen Werte für Aldehyd sind meist um ein geringes zu hoch, und zwar ist der Fehler um so größer, je größer der Überschuß an zugesetzter Silbernitratlösung ist. Auch bei einem Überschuß von 4 ccm Silbernitratlösung bleibt dieser Fehler immer noch in der Größenordnung von etwa 0,5—0,75 mg.

**b) Bestimmung des Acetons nach A. I. KOGAN<sup>1</sup>.** Durch kurze Behandlung mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung läßt sich die Oxydation des Acetaldehyds vollständig durchführen, während das Aceton hierbei nicht angriffen wird. Man verfährt folgendermaßen:

Zu 50—100 ccm einer Acetaldehyd und Aceton enthaltenden wäßrigen Lösung fügt man in einem Meßkolben von 200 ccm 5 ccm 25%ige Schwefelsäure und 3—4 ccm 5%ige Kaliumpermanganatlösung hinzu. Nach dem Umrühren läßt man die Lösung 5 Minuten stehen. Bei Anwesenheit von Acetaldehyd entsteht ein dunkelbrauner Niederschlag von Mangandioxyd. Wenn dabei die rotviolette Färbung der Flüssigkeit verschwunden ist, so fügt man nach und nach solange Kaliumpermanganatlösung hinzu, bis die rotviolette Färbung der Flüssigkeit während 5 Minuten bestehen bleibt. Nun setzt man tropfenweise Formaldehydlösung (Perhydrol MERCK) hinzu, bis die Färbung sowie der Niederschlag verschwunden und die Flüssigkeit farblos und durchsichtig geworden ist. Unter Schütteln fügt man darauf 10%ige Natronlauge hinzu bis zum Auftreten eines beständigen Niederschlages von Manganoxyd, wonach man noch einen Überschuß von 20 ccm 10%iger Natronlauge hinzugibt. Zur Zerstörung eines etwa vorhandenen Überschusses von Wasserstoffsuperoxyd gießt man eine 10%ige Lösung von wasserfreiem Mangansulfat hinzu. Wenn beim Schütteln in dem dunkelbraunen Niederschlag von Mangandioxyd weiße Flocken von Manganoxyd zu bemerken sind, ist Mangansulfat im Überschuß vorhanden. Gewöhnlich genügen dazu 10 ccm 10%iger Mangansulfatlösung vollständig. Die Lösung verdünnt man im Kolben mit Wasser bis zur Marke, schüttelt tüchtig und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter. In 100 ccm des Filtrates bestimmt man das Aceton nach MESSINGER (s. S. 1063).

**c) Über ein abgeändertes HÄGGLUNDSches Verfahren berichtet S. YAMADA<sup>2</sup>.** In einem Teil der Probe bestimmt man den Acetaldehyd durch Oxydation, in einem anderen Acetaldehyd + Aceton nach dem Bisulfitverfahren.

<sup>1</sup> A. I. KOGAN: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 116.

<sup>2</sup> S. YAMADA: Journ. Soc. chem. Ind. Japan 1933, 36, 193 B; C. 1933, II, 1502.

### 7. Nachweis und Bestimmung von Aceton neben Acetaldehyd und Formaldehyd nach E. PITTARELLI<sup>1</sup>.

Formaldehyd und Acetaldehyd reagieren mit den neutralen Salzen des Hydrazins und seiner Derivate und des Hydroxylamins unter Freiwerden von Mineralsäuren. Aceton tut dies nur mit Hydroxylamin. Um zu entscheiden, ob in einer Lösung neben Formaldehyd und Acetaldehyd noch Aceton vorhanden ist, versetzt man 2 Proben der Lösung mit Methylorange und neutralisiert genau. Zu der einen Probe gibt man eine gegen Methylorange neutrale Lösung von Phenylhydrazin, zu der anderen eine neutrale Hydroxylaminlösung. Der in den Lösungen vorhandene Indicator färbt sich infolge Freiwerden der Säure. Beim Zurücktitrieren läßt sich aus der Differenz zwischen Phenylhydrazin und Hydroxylamin auf das Vorhandensein und auf die Menge von Aceton schließen.

### 8. Bestimmung von Äthylalkohol, Acetaldehyd und Aceton nebeneinander nach K. HOEPNER<sup>2</sup>.

Die Bestimmung des Alkohols und Acetaldehyds erfolgt durch Oxydation beider zu Essigsäure nach dem Chromsäureverfahren (S. 1002), während das Aceton hierbei unverändert bleibt. Die verbrauchte Chromsäure wird jodometrisch ermittelt. In einer zweiten Probe wird das Aceton nach Oxydation von Alkohol und Acetaldehyd durch Abtreiben getrennt und durch Hydroxylaminchlorhydrat in das Ketoxim übergeführt (S. 1033). Die hierbei freiwerdende Salzsäure (1 Molekül) titriert man mittels N.-Lauge. In einer dritten Probe werden Acetaldehyd und Aceton in das Aldoxim und Ketoxim übergeführt und die freigewordene Salzsäure (je 1 Molekül) gemessen. Aus der Differenz der bei den beiden letzten Titrationsen verbrauchten Laugemengen ergibt sich der Gehalt an Acetaldehyd und aus dem Chromsäureverbrauch für die Oxydation von Alkohol und Acetaldehyd nach Abzug des für die Oxydation des Acetaldehyds zu berechnenden Chromsäureverbrauchs der Gehalt an Alkohol. Vor der Analyse ist die zu untersuchende alkoholhaltige Flüssigkeit so weit zu verdünnen, daß 100 ccm nicht mehr als 4—5 ccm Alkohol enthalten.

- Erforderliche Lösungen. 1. 2 N.-Kaliumbichromatlösung, enthaltend 98,066 g/l,  
 2. Schwefelsäure, verdünnte, hergestellt aus 500 g oder 275 ccm Schwefelsäure ( $D = 1,84$ ) und 500 ccm Wasser,  
 3. Ferrosulfatlösung, enthaltend 250 g/l Ferrosulfat,  
 4. Natronlauge, enthaltend 100 g/l Natriumhydroxyd,  
 5. Hydroxylaminchlorhydratlösung, enthaltend 100 g/l,  
 6. Methylorange, enthaltend 1 g/l,  
 7. Kaliumjodidlösung, enthaltend 100 g/l,  
 8. 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung.

Bestimmung des Acetons. 20 ccm des verdünnten Gemisches läßt man in 50 ccm 2 N.-Kaliumbichromatlösung einfließen und fügt 100 ccm verd. Schwefelsäure hinzu, wobei man im fließenden Wasser kühlt. Nach 2—3 Stunden werden zur Reduktion der unveränderten Chromsäure 100 ccm Ferrosulfatlösung hinzugegeben. Unter Vorlage von 5 ccm Natronlauge und 20 ccm Wasser werden etwa 75 ccm abgetrieben, und von diesem Abtriebe werden wiederum etwa 50 ccm unter Vorlage von 20 ccm Hydroxylaminchlorhydratlösung abgetrieben. Nach einer Stunde mißt man die bei der Umsetzung freigewordene Salzsäure mit N.-Natronlauge und Methylorange als Indicator. 1 ccm N.-Natronlauge = 0,05805 g Aceton. Ein Leerversuch der Hydroxylaminchlorhydratlösung mit Natronlauge ist auszuführen und in Anrechnung zu bringen.

Bestimmung des Acetaldehyds. 20 ccm des verdünnten Gemisches läßt man in ein Gemisch von 20 ccm Hydroxylaminchlorhydratlösung und 20 ccm Wasser einfließen. Nach Verlauf von 1 Stunde wird wie vorher die freigewordene Salzsäure titriert und der bei dem Leerversuch erhaltene Wert berücksichtigt. Der Aldehydgehalt berechnet sich

<sup>1</sup> E. PITTARELLI: Arch. Farmacologia sperim. 1920, 29, 70; C. 1920, IV, 616.

<sup>2</sup> K. HOEPNER: Z. 1917, 34, 453.

aus dem Unterschiede zwischen dem ermittelten Verbräuche an N.-Natronlauge vor und nach der Oxydation. 1 ccm N.-Natronlauge = 0,04403 g Acetaldehyd.

Bestimmung des Alkohols. 10 ccm des verdünnten Gemisches läßt man in 25 ccm 2 N.-Kaliumbichromatlösung einfließen, setzt 50 ccm verd. Schwefelsäure hinzu und kühlt unter der Wasserleitung. Nach 2—3 Stunden bringt man den Inhalt des Kolbens unter Nachspülen in einen Meßkolben von 500 ccm und füllt zur Marke auf. Darauf pipettiert man 50 ccm in einen Jodkolben, versetzt mit etwa 20 ccm Kaliumjodidlösung und titriert nach 10—15 Minuten unter Zusatz von Wasser und unter Verwendung von Stärkelösung mit Natriumthiosulfatlösung. Zur Feststellung des Wirkungswertes der Thiosulfatlösung dient ein Leer Versuch, in dem 25 ccm 2 N.-Kaliumbichromatlösung und 50 ccm verd. Schwefelsäure in gleicher Weise zu 500 ccm verdünnt und mit Thiosulfatlösung titriert werden.

Für die Berechnung ist der dem vorher bestimmten Aldehydgehalt entsprechende Thiosulfatverbrauch zu ermitteln und in Abzug zu bringen. 1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung = 0,00115 g Äthylalkohol und = 0,00220 g Acetaldehyd.

Bestimmung geringer Aldehyd- und Acetonmengen. Wenn 5 ccm der unverdünnten alkoholischen Lösung nach Einfließenlassen in 20 ccm Hydroxylaminchlorhydratlösung weniger als 5 ccm N.-Natronlauge verbrauchen, so ist der Gehalt an Aceton und Aldehyd im Vergleich zum Alkoholgehalt sehr gering. In diesem Falle muß eine Anreicherung an Aceton und Aldehyd vorgenommen werden, indem man 100 ccm der unverdünnten alkoholischen Lösung mit 100 ccm gesättigter Calciumchloridlösung versetzt und unter Benutzung eines geeigneten Aufsatzes der Destillation unterwirft. Hierbei werden 5 ccm Wasser in einem Mischzylinder von 50 ccm Inhalt vorgelegt und zwar so, daß der Vorstoß in das Wasser eintaucht. Sind etwa 40 ccm übergegangen, so werden von dem Destillat nach Zusatz von 50 ccm gesättigter Calciumchloridlösung nochmals 20 ccm abdestilliert und in etwa 5 ccm Wasser aufgefangen. Schließlich werden auch von diesem Abtriebe nach Zugabe von 50 ccm gesättigter Calciumchloridlösung 8—10 ccm abgetrieben und in etwa 15 ccm Wasser aufgefangen. Dieses Destillat enthält neben Alkohol sämtlichen Aldehyd, nicht aber das ganze Aceton. Es wird in einen 500 ccm-Meßkolben übergeführt, worauf die Bestimmung des Acetons und Aldehyds, wie vorher beschrieben, ausgeführt wird. Der im Destillationsrückstande verbliebene Acetonrest entspricht der Differenz zwischen dem Laugenverbrauch der unverdünnten ursprünglichen alkoholischen Lösung und demjenigen der angereicherten verdünnten Lösung vor der Oxydation. Hat z. B. die bei der Umsetzung von 5 ccm der ursprünglichen Mischung mit Hydroxylaminchlorhydratlösung freigewordene Salzsäure  $3,0 - 0,2 = 2,8$  ccm N.-Lauge und haben 25 ccm der angereicherten und im Verhältnis von 100:500 ccm verdünnten Lösung (= 5 ccm der ursprünglichen Mischung) vor der Oxydation  $2,45 - 0,2 = 2,25$  ccm und nach der Oxydation  $1,0 - 0,2 = 0,8$  ccm N.-Lauge verbraucht, so berechnet sich der in 100 ccm der ursprünglichen Mischung enthaltene Aldehyd auf  $(2,25 - 0,8) \cdot 0,04403 \cdot 20 = 1,28$  g und das Aceton auf  $[0,8 + (2,8 - 2,25)] \cdot 0,05805 \cdot 20 = 1,57$  g.



# Organische Säuren.

Von

Professor **DR. A. BÖMER** und **DR. O. WINDHAUSEN**-Münster i. W.

Mit 11 Abbildungen.

In diesem Kapitel werden der Nachweis und die Bestimmung der wichtigsten organischen Säuren (Ameisen-, Essig-, Butter-, Oxal-, Bernstein-, Milch-, Äpfel-, Wein-, Citronen-, Benzoe-, Salicyl- und Zimtsäure) behandelt, die teils in den Lebensmitteln natürlich vorkommen, teils als Konservierungsmittel ihnen zugesetzt werden. Daneben sind noch einige sonstigen Säuren (Propion-, Valerian-, Fumar-, Malon-, Glykol-, Glyoxal-, Brenztrauben- und Lävulinsäure) mit aufgenommen worden, die zwar für die Praxis von geringerer Bedeutung sind, deren Nachweis und Bestimmung aber bei wissenschaftlichen Arbeiten gelegentlich erforderlich sind.

Über den Nachweis und die Bestimmung der in den Fetten vorkommenden höheren Fettsäuren siehe Band IV.

## I. Allgemeines.

### 1. Acidimetrische Bestimmung<sup>1</sup>.

Die organischen Säuren können als schwache Säuren acidimetrisch durch Neutralisation mit 0,1 N.-Natronlauge gegen Phenolphthalein als Indicator bestimmt werden; außer Phenolphthalein kann auch Thymolblau verwendet werden. Mit alkaliempfindlichen Indicatoren wie Dimethylgelb erhält man falsche Ergebnisse.

Der saure Charakter der Oxy Säuren kann nach G. BRUHNS<sup>2</sup> durch Zusatz der Salze der Erdalkali- und Schwermetalle erhöht werden: Zu 25 ccm 0,1 N.-Säure setzt man 4—5 g krystallisiertes Calciumchlorid hinzu. Besser als mit Dimethylgelb kann man dann z. B. Oxalsäure mit Methylrot titrieren.

1 ccm 0,1 N.-Lauge entspricht hierbei:

|                       |        |                        |        |                        |        |
|-----------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|
| Ameisensäure . . .    | 4,6 mg | Oxalsäure . . . . .    | 6,3 mg | Weinsäure . . . . .    | 7,5 mg |
| Essigsäure . . . . .  | 6,0 „  | Bernsteinsäure . . . . | 5,9 „  | Citronensäure . . . .  | 7,0 „  |
| Propionsäure . . . .  | 7,4 „  | Glykolsäure . . . . .  | 7,6 „  | Benzoessäure . . . .   | 12,2 „ |
| Buttersäure . . . . . | 8,8 „  | Milchsäure . . . . .   | 9,0 „  | Salicylsäure . . . . . | 13,8 „ |
| Valeriansäure . . . . | 10,2 „ | Äpfelsäure . . . . .   | 6,7 „  | Zimtsäure . . . . .    | 14,8 „ |

Zur Bestimmung schwacher organischer Säuren (Milch-, Äpfel-, Wein-, Citronensäure usw.) kann man auch die acidimetrische Stufentitration (S. 196) verwenden; insbesondere haben sie J. TILLMANS und E. WEIL<sup>3</sup> zur Bestimmung der Milchsäure, ferner P. HIRSCH und K. RICHTER<sup>4</sup> für Bernstein-, Äpfel-, Wein-, Citronen- und Milchsäure angewendet.

<sup>1</sup> I. M. KOLTHOFF: Die Maßanalyse, Bd. 2, S. 115. Berlin: Julius Springer 1928.

<sup>2</sup> G. BRUNS: Zeitschr. analyt. Chem. 1916, 55, 321.

<sup>3</sup> J. TILLMANS u. E. WEIL: Z. 1929, 57, 515.

<sup>4</sup> P. HIRSCH u. K. RICHTER: Z. 1929, 58, 433.

## 2. Jodometrische Bestimmung<sup>1</sup>.

Versetzt man eine Säurelösung mit neutralem Jodid und Jodat im Überschuß, so werden die freien Säuren in die Neutralsalze überführt und gleichzeitig je Säureäquivalent 1 Atom Jod abgeschieden. Die Titration der schwachen Säuren gelingt in allen Fällen, wenn man nach folgender Vorschrift arbeitet: 20 ccm 0,1 N.-Säure werden mit 1 g Kaliumjodid, 5 ccm Kaliumjodatlösung (3%) und 25 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung gemischt und nach 15—30 Minuten langem Stehen wird mit 0,1 N.-Jodlösung zurücktitriert.

Essigsäure, Bernsteinsäure, Benzoesäure, Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure usw. können so quantitativ erfaßt werden. Die jodometrische Methode kann mit Vorteil auf eigengefärbte Lösungen angewandt werden, wo der Umschlag mit den gewöhnlichen Farbindicatoren nicht mehr zu erkennen wäre.

## 3. Oxydimetrische Bestimmung<sup>2</sup>.

a) Mit Kaliumpermanganat. Zu etwa 10 ccm 0,1 N.-Säurelösung (Normalität auf die vollständige Oxydation bezogen) gibt man 25 ccm 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung und 10 ccm 4 N.-Natronlauge. Nach etwa 24stündigem Stehen — bei Ameisensäure nach 1 Stunde — im verschlossenen Kolben säuert man mit 25 ccm 4 N.-Schwefelsäure an und titriert den Permanganatüberschuß einige Stunden später — bei Ameisensäure sofort — mit 0,1 N.-Oxalsäurelösung zurück.

Der Permanganatverbrauch für die einzelnen Säuren ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Essig, Propion, Butter-, Valerian-, Bernstein- und Benzoesäure werden nicht oxydiert.

b) Mit Cerisulfat nach H. H. WILLARD und PH. YOUNG<sup>3</sup>. Gegenüber

Kaliumpermanganat besitzt Cerisulfat den Vorteil, daß Salzsäure die Titration nicht stört, und daß die Cerisalzlösungen länger titerbeständig sind als die Permanganatlösungen; das Cerisulfat  $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$  wird dabei zu Cerosulfat  $[\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3]$  reduziert. Zur Erkennung des Endpunktes ist ein Indicator erforderlich.

Zur Herstellung der Titerlösung geht man vom käuflichen Cerooxalat aus, glüht dieses etwa bei 625° zu Cerioxyd ( $\text{CeO}_2$ ) und behandelt dann mit so viel Schwefelsäure ( $d = 1,5$ ), daß die entstehende Lösung etwa 1—2 normal ist. Man erwärmt auf 125°, bis der Rückstand gelblich aussieht, verdünnt auf etwa 0,1 N.-Cerisalzkonzentration, erwärmt nochmals 1 Stunde auf dem Wasserbade bei 70—80° und filtriert. Die Einstellung erfolgt entweder gegen Oxalsäure oder gegen Eisensalze. Um schädliche Einflüsse von Salpetersäure, Phosphorsäure und Flußsäure zu verhindern, setzt man etwas Jodmonochlorid (0,005 molar) hinzu.

Man versetzt etwa 200 ccm der zu untersuchenden Säurelösung mit soviel Schwefelsäure ( $d = 1,5$ ), daß auf 200 ccm 30—60 ccm dieser Schwefelsäure kommen. Dann fügt man Cerisulfatlösung im Überschuß hinzu, erhitzt

Tabelle 1.

| Säure            | ccm N.-Oxydans für 1 Millimol Säure | ccm N.-Permanganat für 1 g Säure | 1ccm 0,1 N.-Permanganat = mg Säure |
|------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Ameisensäure .   | 1                                   | 43,5                             | 2,3008                             |
| Oxalsäure . . .  | 2                                   | 22,2                             | 4,5045                             |
| Weinsäure . . .  | 10                                  | 66,7                             | 1,4993                             |
| Citronensäure .  | 18                                  | 93,7                             | 1,0672                             |
| Glykolsäure . .  | 6                                   | 79,0                             | 1,2658                             |
| Milchsäure . . . | 12                                  | 133,3                            | 0,7502                             |
| Äpfelsäure . . . | 12                                  | 89,5                             | 1,1173                             |
| Salicylsäure . . | 28                                  | 20,3                             | 4,9261                             |
| Zimtsäure . . .  | 10                                  | 67,6                             | 1,4793                             |

<sup>1</sup> I. M. KOLTHOFF: Die Maßanalyse, Bd. 2, S. 376. Berlin: Julius Springer 1928.

<sup>2</sup> I. M. KOLTHOFF: Die Maßanalyse, Bd. 2, S. 328. Berlin: Julius Springer 1928.

<sup>3</sup> H. H. WILLARD u. PH. YOUNG: Journ. Amer. Chem. Soc. 1928, 50, 1322; 1929, 51, 149; 1930, 52, 132.

30 Minuten auf dem Wasserbade, läßt abkühlen und titriert den Cerüberschuß mit Ferrosulfatlösung gegen Diphenylamin (0,3—0,5 ccm 0,1 % ige Lösung) zurück.

Die Titration läßt sich bei Wein-, Äpfel-, Citronen-, Malon- und Glykolsäure anwenden, nicht dagegen bei Ameisen-, Essig-, Bernstein- und Fumarsäure, die nicht oxydiert werden, während bei Benzoe- und Salicylsäure die Oxydation eine unregelmäßige ist.

Bei der Malonsäure werden die 200 ccm Malonsäurelösung in die mit Schwefelsäure versetzte Cerisulfatlösung gegeben. Es darf nicht umgekehrt verfahren werden, da dann eine teilweise Zersetzung der Malonsäure nicht zu vermeiden ist.

Es entspricht 1 ccm 0,1 N.-Cerisulfatlösung:

|                     |          |                         |          |                       |          |
|---------------------|----------|-------------------------|----------|-----------------------|----------|
| Weinsäure. . . . .  | 2,084 mg | Citronensäure . . . . . | 1,211 mg | Glykolsäure . . . . . | 1,923 mg |
| Äpfelsäure. . . . . | 1,449 „  | Malonsäure . . . . .    | 1,563 „  |                       |          |

#### 4. Kennzeichnung der Säuren durch ihre Ester.

Zur Kennzeichnung der Säuren können nach E. E. REID und Mitarbeitern die Schmelzpunkte ihrer Phenacyl- sowie der p-Chlor-, p-Brom- und p-Jodphenacylester, ihrer p-Phenylphenacyl- und p-Nitrobenzylester dienen. Die Schmelzpunkte dieser Ester sind in der Tabelle 2 auf S. 1075 zusammengestellt. Man stellt diese Ester, wie folgt, dar:

a) Phenacylester nach J. B. RATHER und E. E. REID<sup>1</sup>. Durch Lösen von 20 g Acetophenon ( $C_6H_5 \cdot CO \cdot CH_3$ ) in 30 ccm Eisessig, langsames Zugeben von 28 g Brom unter Schütteln und zum Schluß kurzes Erhitzen in warmem Wasser erhält man Phenacylbromid ( $\omega$ -Bromacetophenon). Das Reaktionsprodukt wird in Eiswasser gegossen und nach 1 Stunde filtriert; weiße Krystalle vom Schmp. 50°. Die Phenacylester erhält man durch Einwirkung von 1 g Phenacylbromid auf etwas mehr als die äquivalente Menge der zu untersuchenden Säure unter Zusatz von etwas weniger Natriumcarbonat, als zur Neutralisation der Säure erforderlich ist, und 15 ccm Alkohol (63%). Man löst die Säure und die nötige Menge Natriumcarbonat unter Erwärmen in 5 ccm Wasser und setzt nach Zugabe des Phenacylbromids 10 ccm Alkohol (95%) hinzu. Bei einbasischen Säuren kocht man 1, bei zweibasischen 2 und bei dreibasischen 3 Stunden.

b) p-Chlor-, Brom- und Jodphenacylester nach W. L. JUDEFIND und E. E. REID<sup>2</sup>. Zur Darstellung dieser Ester werden zunächst die p-Halogenphenacylbromide dargestellt, indem man 112 g Monochlor-, 157 g Monobrom- bzw. 204 g Jodbenzol mit 85 g Acetylchlorid und 150 g wasserfreiem Aluminiumchlorid in 250 g Schwefelkohlenstoff verwendet; man erhält damit p-Chloracetophenon (bei 230—240° siedend), p-Bromacetophenon (Schmp. 50,5°) bzw. p-Jodacetophenon (83,5°). Diese Acetophenone werden in Eisessig bromiert, wodurch man p-Chlorphenacylbromid (Schmp. 96,5° aus Alkohol), p-Bromphenacylbromid (109,7°) bzw. p-Jodphenacylbromid (113,5°) erhält. Zur Darstellung der Säureester werden diese Halogenphenacylbromide mit den Alkalisalzen der Säuren in verdünnten alkoholischen Lösungen gekocht und die Ester aus verd. Alkohol krystallisiert.

c) p-Phenylphenacylester nach N. L. DRAKE und J. BRONITSKY<sup>3</sup>. Durch Erhitzen von Diphenyl in Schwefelkohlenstoff mit Acetanhydrid in Gegenwart von Aluminiumchlorid erhält man p-Phenylacetophenon (Schmp. 120—121° aus Alkohol). Durch langsames Hinzufügen von Brom zu der Lösung in Eisessig entsteht p-Phenylphenacylbromid (125,5° aus Alkohol). Zur Darstellung der Ester werden 0,005 Mol der zu untersuchenden Säure zu 5 ccm Wasser in einem ERLÉNMEYER-Kölbchen, mit 0,0025 Mol Natriumcarbonat gesetzt und dann wird noch soviel Säure hinzugegeben, daß die Lösung gerade eben sauer gegen Lackmus wird. Dann werden 10 ccm Alkohol und 0,005 Mol des Bromides hinzugegeben und die Mischung 1 Stunde oder mehr unter Rückfluß gekocht. Sollte dabei das Natriumsalz durch den Alkohol ausgefällt werden, so wird Wasser bis zur Lösung zugesetzt.

d) p-Nitrobenzylester nach E. E. REID<sup>4</sup>. p-Nitrobenzylbromid (Schmp. 99°), erhalten durch Erwärmen von p-Nitrotoluol mit Brom — in 2 Tln. zugesetzt — im

<sup>1</sup> J. B. RATHER u. E. E. REID: Journ. Amer. Chem. Soc. 1919, 41, 75; C. 1919, III, 48.

<sup>2</sup> W. L. JUDEFIND u. E. E. REID: Journ. Amer. Chem. Soc. 1920, 42, 1043; C. 1920, III, 310. — Vgl. auch C. G. MOSES u. E. E. REID: Journ. Amer. Chem. Soc. 1932, 54, 2101; C. 1932, II, 1001.

<sup>3</sup> N. L. DRAKE u. J. BRONITSKY: Journ. Amer. Chem. Soc. 1930, 52, 3715; C. 1930, II, 2648.

<sup>4</sup> E. E. REID: Journ. Amer. Chem. Soc. 1917, 39, 124; C. 1917, I, 998.

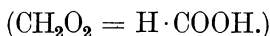
geschlossenen Rohr auf 125—130°, gibt, mit den Alkalisalzen der Säuren in Alkohol (63%) die Ester, die durch Umkrystallisieren aus mehr oder weniger verdünntem Alkohol gereinigt werden.

Tabelle 2. Schmelzpunkte von Phenacyl-, Nitrobenzylestern usw. organischer Säuren. (Krystallisationen durchweg aus Alkohol<sup>1</sup>; Ausnahmen siehe in den Anmerkungen.)

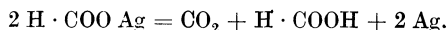
| Bezeichnung der Säure  | Säuren             | Phenacylester    | p-Chlor-      | p-Brom-          | p-Jod- | Phenyl- | p-Nitrobenzylester |
|--|--------------------|------------------|---------------|------------------|--------|---------|--------------------|
|  |                    |                  | phenacylester |                  |        |         |                    |
| Ameisensäure (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) . . .                     | 8,4                | flüssig          | 128           | 135,2            | 163,0  | 74      | 31,0               |
| Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ) . . . . .     | 16,7               | 78               | 72,4          | 86,0             | 117,0  | 111     | 78                 |
| Buttersäure (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) . . . . .    | 4,7                | flüssig          | 55,0          | 63,0             | 81,5   | 97      | 35                 |
| Oxalsäure (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) . . . . .      | 101,5 <sup>2</sup> | —                | —             | —                | —      | 165,5   | 204,5              |
| Bernsteinsäure (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ) . . . . . | 185                | 148              | 197,5         | 211              | —      | 208     | 88,4               |
| Milchsäure (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ) . . . . .     | 18                 | 96               | —             | 112,8            | 139,8  | 145     | flüssig            |
| Äpfelsäure (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ) . . . . .     | 100                | 106              | —             | 179 <sup>3</sup> | —      | —       | 124,5 <sup>4</sup> |
| Weinsäure (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> ) . . . . .      | 170                | 130              | —             | —                | —      | 204     | 163                |
| Citronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ) . . . . .  | 153                | 105              | —             | 148              | —      | 146     | 102                |
| Benzoessäure (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) . . . . .   | 121,7              | 119              | 118,0         | 119              | 126,5  | 167     | 89                 |
| Salicylsäure (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ) . . . . .   | 157,0              | 110              | —             | 140              | —      | 148     | 96,3               |
| Zimtsäure (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) . . . . .      | 136,8              | 140,5            | —             | 145,6            | —      | 182,5   | 116,7              |
| Propionsäure (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) . . . . .   | —19,7              | —                | 98,2          | 63,4             | 98,0   | 102     | 31                 |
| Valeriansäure (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) . . . . . | —34,5              | flüssig          | 97,8          | 75,0             | 81,0   | 63,5    | —                  |
| Fumarsäure (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ) . . . . .     | 287                | 205 <sup>5</sup> | —             | —                | —      | —       | 150,8              |
| Malonsäure (C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ) . . . . .     | 135,6              | —                | —             | —                | —      | 175     | 85,5               |
| Glykolsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ) . . . . .    | 80                 | —                | 94,4          | 104,8            | —      | —       | —                  |

## II. Nachweis und Bestimmung der einzelnen Säuren.

### 1. Ameisensäure.



Ameisensäure ist eine stechend riechende, die Haut stark ätzende, brennbare Dämpfe entwickelnde Flüssigkeit, die in der Kälte erstarrt und dann bei 8,43° schmilzt; Siedepunkt 101°; Spez. Gewicht (20°) = 1,2196, ( $\frac{15^\circ}{10}$ ) = 1,2260. Sie ist mit Wasser und Alkohol in jedem Verhältnis mischbar. — Die Salze mit Ausnahme des Bleiformiat sind in Wasser gut löslich; das Bleiformiat löst sich im Überschuß von Bleiacetat. — Die Ameisensäure zeichnet sich durch ihre leichte Oxydierbarkeit aus, wobei Kohlendioxyd und Wasser entstehen; sie wirkt deshalb auf eine Anzahl Substanzen reduzierend. Silbernitrat erzeugt in konz. Lösung eine weiße, krystallinische Fällung von Silberformiat, das beim Erwärmen metallisches Silber abscheidet.



Ist Ammoniak zugegen, so findet keine Silberabscheidung statt. In analoger Weise werden Mercurichloridlösung zu Mercurochlorid, Gold- und Platinsalzlösung zu den Metallen reduziert. FEHLINGSche Lösung wird durch Ameisensäure nicht reduziert. Erwärmt man eine alkalische Lösung von Ameisensäure mit Kaliumpermanganat, so entsteht eine Ausscheidung von Mangandioxyd. Verd. Schwefelsäure setzt aus Formiaten die Ameisensäure in Freiheit, erkennbar an dem stechenden Geruch; konz. Schwefelsäure zersetzt alle Formiate unter

<sup>1</sup> Zum Teil auch aus mehr oder weniger verd. Alkohol.

<sup>2</sup> Wasserhaltige Säure (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O); die wasserfreie Säure schmilzt bei 189,5°.

<sup>3</sup> Aus Aceton krystallisiert.

<sup>4</sup> Neutraler Ester; der saure Ester schmilzt bei 87,2°.

<sup>5</sup> Aus Essigsäure krystallisiert.

Entwicklung von Kohlenoxyd. Durch nascierenden Wasserstoff wird Ameisensäure zu Formaldehyd reduziert.

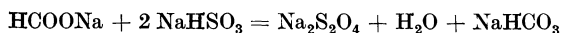
Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an Ameisensäure folgende Reinheitsanforderungen:

Ameisensäure gibt mit Bleiessig einen weißen, krystallinischen Niederschlag. — Erhitzt man das Gemisch von 1 ccm Ameisensäure, 5 ccm Wasser und 1,5 g gelbem Quecksilberoxyd unter wiederholtem Umschwenken im siedenden Wasserbade, so scheidet sich allmählich unter Gasentwicklung graues Quecksilber ab. Wird das Erhitzen des so erhaltenen grauen Quecksilbergemisches im siedenden Wasserbade so lange fortgesetzt, bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet, so darf das Filtrat Lackmuspapier nicht röten (Essigsäure). — Die Mischung von 1 ccm Ameisensäure und 5 ccm Wasser darf nach Zusatz einiger Tropfen Salpetersäure weder durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure), noch durch Silbernitratlösung (Salzsäure), noch nach dem annähernden Neutralisieren mit Ammoniakflüssigkeit durch verd. Calciumchloridlösung (Oxalsäure) oder durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Schwermetallsalze) verändert werden.

### a) Nachweis.

$\alpha$ ) Nachweis nach H. FINCKE<sup>1</sup>. 10 ccm der zu prüfenden schwach sauren Lösung werden in ein Reagensglas gegeben; darauf drückt man etwa 0,5 g Magnesiumband mittels Glasstabes in die Flüssigkeit unter. Unter guter Kühlung (Einstellen in kaltes Wasser) fügt man 6 ccm Salzsäure ( $d = 1,124$ ) tropfenweise innerhalb 15 Minuten hinzu, läßt noch 5 Minuten stehen und prüft dann 5 ccm der abgegossenen Flüssigkeit mit Pepton und Eisenchlorid-Salzsäure auf Formaldehyd (S. 1030).

$\beta$ ) Nachweis nach E. COMANUCCI<sup>2</sup>. Erwärmt man 5 ccm der auf Ameisensäure zu prüfenden Lösung mit 15 Tropfen 50%iger Natriumbisulfidlösung, so entsteht bei Anwesenheit von Ameisensäure eine gelbrote Färbung. Überschichtet man nach dem Abkühlen mit einer frisch bereiteten verd. Lösung von Natriumnitroprussid, so entsteht eine mehr oder weniger starke grüne oder blaue Färbung. Als Endprodukt der Reaktion entsteht ein blauer Niederschlag. Die Farbreaktion ist auf eine intermediäre Bildung von Hydrosulfit oder Unterschwefliger Säure zurückzuführen.



Nach G. DENIGÈS<sup>3</sup> kann die Bildung des Hydrosulfites auch durch Entfärbung verd. Methylenblaulösung nachgewiesen werden. Man bringt zu 5 ccm der auf Ameisensäure zu prüfenden Lösung 5 Tropfen einer wäßrigen Methylenblaulösung (1:5000), kocht auf und fügt 5 Tropfen einer Natriumbisulfidlösung (36—40° Baumé) hinzu; bei Anwesenheit von Ameisensäure entfärbt sich die Methylenblaulösung. Man kann auf diese Weise 1 mg Ameisensäure in 1 ccm Lösung nachweisen. Reagiert die Lösung alkalisch, so muß man sie mit verd. Salzsäure oder Schwefelsäure ansäuern.

$\gamma$ ) Reaktionen mit konz. Schwefelsäure. Beim Erwärmen mit konz. Schwefelsäure wird die Ameisensäure in Wasser und Kohlenoxyd gespalten. Nach TH. CURTIUS und H. FRANZEN<sup>4</sup>) kann man das gebildete Kohlenoxyd durch Palladiumchlorür nachweisen. Man fängt das Kohlenoxyd in einer Lösung von Kupferchlorür und Natriumchlorid auf; nach dem Verdünnen mit Wasser entsteht bei Zusatz von Palladiumchlorür sofort ein Niederschlag von metallischem Palladium.

$\delta$ ) Sonstige Reaktionen.  $\alpha\alpha$ ) Löst man Ameisensäure in möglichst wenig Äther oder Chloroform und versetzt mit dem doppelten Volumen Petroläther und etwas Anilin, so fallen Nadeln vom Schmelzpunkt 64° (Anilinformiat) aus. Empfindlichkeit = 0,1%<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> H. FINCKE: Z. 1913, 25, 389. Abgeänderte Methode von H. J. H. FENTON u. H. A. SISSON: Proceed. Cambridge philos. Soc. 1908, 14, 385; C. 1908, I, 1379.

<sup>2</sup> Estr. ans. Rend. della R. Accad. delle Science Fisiche e Matematiche di Napoli 1904, 2/7; C. 1904, II, 1168. — Boll. chim. farmac. 1918, 57, 101; C. 1919, II, 266.

<sup>3</sup> G. DENIGÈS: Bull. Soc. Pharmac. Bordeaux 1911, 51, 151; Z. 1914, 27, 552.

<sup>4</sup> TH. CURTIUS u. H. FRANZEN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1912, 45, 1715.

<sup>5</sup> M. MASRIERA: Quimica e Industria 1, 141; C. 1924, II, 1835.

$\beta\beta$ ) Dampft man Ameisensäure mit einem kleinen Überschuß von Calciumcarbonat zur Trockne ein und erhitzt im Reagensglase, so geben die in Wasser aufgefangenen Dämpfe die Reaktionen des Formaldehyds.

$\gamma\gamma$ ) Beim vorsichtigen Erhitzen der Ameisensäure mit Kaliumäthylsulfat tritt der Geruch des Ameisensäureäthylesters auf<sup>1</sup>.

$\delta\delta$ ) Für den mikrochemischen Nachweis ist das Verfahren von F. KRAUSS und H. TAMPKE<sup>2</sup> mit Resorcin und Schwefelsäure empfohlen worden.

### b) Bestimmung.

Die größte Zahl der Bestimmungsmethoden beruht auf der Umsetzung der Ameisensäure mit Quecksilberchlorid. Von diesen Methoden hat sich in der Praxis besonders das Verfahren von H. FINCKE bewährt. AUERBACH und PLÜDDEMANN haben es zu einer maßanalytischen Bestimmung ausgearbeitet, die jedoch nur bei Reihenversuchen mit Vorteil zu verwenden ist. F. WOHACK hat das Verfahren von FINCKE zu einer Mikromethode umgearbeitet. Zu den genauesten Bestimmungsmethoden gehört auch das gasvolumetrische Verfahren nach A. HANAK. Zu Serienbestimmungen besonders geeignet ist das Oxydationsverfahren mit Permanganat.

$\alpha$ ) Bestimmung nach H. FINCKE<sup>3</sup>. Die neutrale oder schwach saure Lösung der Ameisensäure, deren Volumen bei geringen Mengen (bis 100 mg) 50—100 ccm, bei größeren Mengen (etwa über 50 mg) 100—300 ccm betragen soll, wird mit 3—5 g Natriumacetat und mindestens dem 15fachen<sup>4</sup> der voraussichtlichen Ameisensäuremenge betragenden Gewichte Quecksilberchlorid versetzt und in einem ERLLENMEYER-Kolben, auf den mittels Gummistopfens ein etwa 30—40 cm langes Glasrohr als Rückflußkühler aufgesetzt ist, 2 Stunden im siedenden Wasser- oder Dampfbade erhitzt, derart, daß der Kolben wenigstens soweit, als er Flüssigkeit enthält, von Dampf umspült wird.

Das Volumen der Flüssigkeit kann — ohne daß die Genauigkeit Schaden leidet —, in ziemlich weiten Grenzen schwanken, bei ganz geringen Ameisensäuremengen wählt man es natürlich möglichst klein. Das Quecksilberchlorid ist nicht in fester Form, sondern in Lösung zuzusetzen, welche man zweckmäßig durch Lösen von 100 g Quecksilberchlorid und 30 g Natriumchlorid zu 1 l herstellt. Das Natriumacetat, dessen Menge bei sehr geringen Ameisensäuremengen erniedrigt werden kann und nur dann über 3 g erhöht werden muß, wenn mehr als 125 mg Ameisensäure vorhanden sind, kann in fester Form zugesetzt werden. Das Erhitzen des ERLLENMEYER-Kolbens erfolgt am besten derart, daß man einen oder zwei engere Ringe des Wasserbades über ihn streift und ihn dann mittels Stativ und Klammer so in das Bad einhängt, daß die übergestreiften Ringe mit den übrigen Ringen des Bades eine schließende Fläche bilden; es befindet sich dann wohl der untere, nicht aber der obere Teil des Kolbens im Dampf.

Das beim Erhitzen ausgeschiedene Quecksilberchlorür wird in einem GOOCH-Tiegel abgesaugt und mit warmen Wasser und zuletzt mit Alkohol und Äther gut ausgewaschen. Darauf trocknet man den Niederschlag  $\frac{3}{4}$ —1 Stunde im Wasserdampftrockenschrank (95—100°) und wägt nach dem Erkalten.

Durch Multiplikation mit 0,0975 ergibt sich die vorhandene Ameisensäure.

Bei sehr geringen Ameisensäuremengen — unter 2—3 mg — sind die Fehler verhältnismäßig groß; es empfiehlt sich in diesem Falle, statt durch einen GOOCH-Tiegel durch ein kleines gewogenes Filter von 4—5 cm Durchmesser zu filtrieren und nach dem Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther das Filter 2 Stunden im Wasserdampftrockenschrank und dann 6—12 Stunden im Exsiccator über Phosphorpentoxyd zu trocknen.

<sup>1</sup> BEILSTEIN'S Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 2, S. 13, 1920.

<sup>2</sup> F. KRAUSS u. H. TAMPKE: Chem.-Ztg. 1921, 45, 521. — Vgl. H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 156.

<sup>3</sup> H. FINCKE: Z. 1911, 21, 1; 22, 89; 1913, 25, 386. — Biochem. Zeitschr. 1913, 51, 253. Auf dem gleichen Prinzip beruhen auch die Verfahren von PORTER und KNYSEN (Zeitschr. analyt. Chem. 1877, 16, 250).

<sup>4</sup> G. v. SZELÉNYI (Z. 1932, 63, 534) hat, um genaue Ergebnisse zu erhalten, vorgeschlagen, die 60—100fache Menge Quecksilberchlorid zu verwenden.

Liegt die Ameisensäure nicht in reiner Lösung, sondern in neutraler oder alkalischer Lösung bei Gegenwart von nichtflüchtigen Stoffen vor, so ist sie durch Wasserdampfdestillation der mit Weinsäure angesäuerten Lösung abzutreiben, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Ameisensäure verhältnismäßig schwer flüchtig ist.

Ausführung der Wasserdampfdestillation nach H. FINCKE<sup>1</sup>. Hierzu dient der nachstehende Apparat (Abb. 1)<sup>2</sup>. Mit dem mit Dampfreiniger versehenen Dampfentwickler *A* ist der Kolben *B* von etwa 500 ccm verbunden, in dem sich die Ameisensäurelösung befindet, die durch Erhitzen stets auf dem ursprünglichen Volumen gehalten wird. Enthält die zu untersuchende Lösung Aldehyde oder andere flüchtige Stoffe, die ebenfalls Quecksilberchlorid reduzieren, so

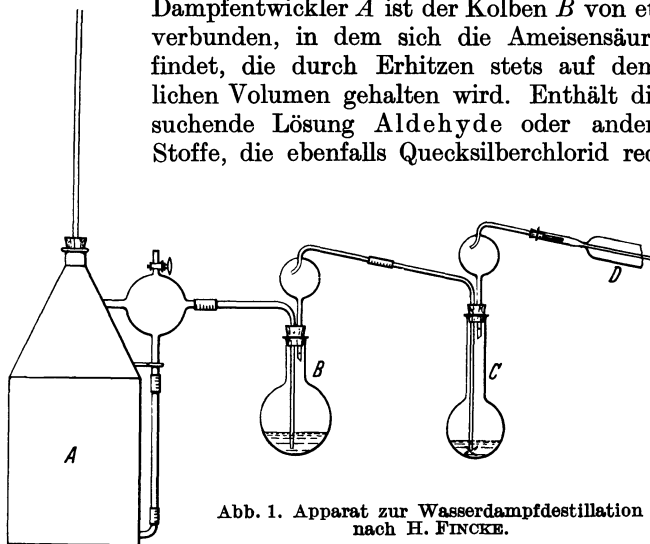


Abb. 1. Apparat zur Wasserdampfdestillation nach H. FINCKE.

leitet man den Wasserdampf aus dem Destillationskolben *B* durch den Kolben *C* mit einer im Sieden gehaltenen Aufschwemmung von Calciumcarbonat, welches die Ameisensäure bindet, während flüchtige Aldehyde nicht zurückgehalten werden. Die Durchleitung des Wasserdampfes durch die in dem langhalsigen Kolben *C* befindliche Aufschwemmung von 2 g Calciumcarbonat in 100 ccm Wasser geschieht zweckmäßig durch das sehr wirksame STOLTZENBERGSche<sup>3</sup> Dampfeinleitungsrohr, welches eine sehr feine Dampfverteilung herbeiführt und damit die Bindung der Ameisensäure fördert. An *C* schließt sich ein LIEBIG'Scher Kühler *D* mit Vorlage an, in der sich Aldehyde und sonstige nicht saure Stoffe ansammeln. Man destilliert mit einem Dampfdruck von 50—100 cm Wassersäule in *A* bei Anwendung von 50 ccm Ameisensäurelösung 1 l und bei 100 ccm 1,5—2 l ab und erhält auf diese Weise etwa 99% der Ameisensäure im Destillat. Nach Beendigung der Destillation wird das Calciumcarbonat aus der Aufschwemmung abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. In dem nötigenfalls eingengteten Filtrat wird die Ameisensäure wie oben bestimmt.

H. FINCKE gibt ferner Verfahren der Ameisensäurebestimmung bei Gegenwart von Schwefliger Säure und Salicylsäure an.

Nach FR. AUERBACH und W. PLÜDDMANN<sup>4</sup> wird die Ameisensäurelösung neutralisiert und nötigenfalls auf ein kleines Volumen eingedampft. Dann bringt man sie unter Zusatz von 3 g Natriumacetat in ein langhalsiges 100 ccm-Kölbchen und fügt eine genau abgemessene Menge Quecksilberchloridlösung hinzu (58,87 g Quecksilberchlorid mit 12 g Natriumchlorid auf 1 l; 1 ccm = 5,0 mg Ameisensäure), und zwar soviel als dem vermutlichen Ameisensäuregehalt zuzüglich 30—50 mg entspricht. Das Kölbchen, das nicht ganz

<sup>1</sup> H. FINCKE: Z. 1911, 21, 1 u. Biochem. Zeitschr. 1913, 51, 253.

<sup>2</sup> Zu beziehen von der Firma Franz Hegershoff-Leipzig.

<sup>3</sup> H. STOLTZENBERG: Chem.-Ztg. 1908, 32, 770.

<sup>4</sup> F. AUERBACH u. W. PLÜDDMANN: Arb. aus d. Kais. Gesundh.-Amt 1906, 30, 178.

voll sein darf, wird bis an den Hals in siedendes Wasser gestellt, 2 Stunden erhitzt, abgekühlt, zur Marke aufgefüllt und filtriert. Das Filtrat, dessen erste Anteile verworfen werden, füllt man in eine Bürette und titriert damit 2 ccm 1,25 N.-Kaliumjodidlösung — unter Vermeidung einer Verdünnung durch Spülwasser — bis zum ersten Auftreten einer rötlichen Färbung.

Wenn  $v$  in der folgenden Tabelle 3 die benötigte Menge der Quecksilberchloridlösung bedeutet, so gibt  $f$  den Faktor an, mit dem  $v$  zu multiplizieren ist, um die 2 ccm 1,25 N.-Kaliumjodidlösung äquivalente Menge Quecksilberchlorid in Kubikzentimeter zu finden.

Tabelle 3.

| $v$ | $f$   | $v$ | $f$   | $v$ | $f$   | $v$ | $f$   |
|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| 20  | 1,036 | 35  | 1,052 | 50  | 1,069 | 65  | 1,084 |
| 25  | 1,042 | 40  | 1,058 | 55  | 1,074 | 70  | 1,090 |
| 30  | 1,047 | 45  | 1,063 | 60  | 1,079 | 75  | 1,095 |

Die Methode ist jedoch nur für Reihenversuche mit Vorteil zu verwenden.

Nach O. RIESSER<sup>1</sup> kann man das ausgeschiedene Quecksilberchlorür auch durch Zusatz von überschüssigem Jod und Rücktitration mit Thiosulfatlösung bestimmen.

Mikrobestimmung nach FR. WOHACK<sup>2</sup>. Das Verfahren ist das gleiche wie bei der obigen Bestimmung nach H. FNOCKE, das gewissermaßen durch 10 dividiert ist. Nur der Überschuß von Calciumcarbonat von 2 g, der bei der Makrobestimmung nötig ist, muß auch bei der Mikrobestimmung aufrecht erhalten werden. Die Flüssigkeit (etwa 5 bis 6 ccm) wird in einem Probierröhrchen gesammelt, mit einem Tropfen verd. Salzsäure angesäuert und mit 5 ccm einer Lösung versetzt, die in 100 ccm 5 g Quecksilberchlorid, 3 g Natriumacetat und 3 g Natriumchlorid enthält. Um den Einfluß unreiner Reagenzien auszuschalten, empfiehlt es sich, das Reagens vor der Verwendung 1 Stunde im kochenden Wasserbade zu erhitzen. Die Mischung wird 1 Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt und das ausgeschiedene Quecksilberchlorür durch ein gewogenes Filterröhrchen nach PREGL filtriert, indem die Flüssigkeit samt Niederschlag mittels eines kleinen Hebers auf das Filterchen gesaugt wird. Das Nachwaschen der Probe und des Filterröhrchens erfolgt abwechselnd mit warmem Wasser und Alkohol ebenfalls durch den Heber. Zuletzt wird mit Alkohol und dann einmal mit Äther gewaschen, das Filterröhrchen 1 Stunde im Wassertrockenschrank getrocknet und gewogen. Der Gehalt an Ameisensäure in der Lösung braucht nicht mehr als 1—2 mg im Kubikzentimeter zu betragen. Faktor zur Umrechnung auf Ameisensäure = 0,0976.

β) Gasvolumetrische Bestimmung. Hierbei wird die Menge des gebildeten Kohlenoxydgases, welches aus Ameisensäure unter Einwirkung von konz. Schwefelsäure entwickelt wird, gemessen. Methoden dieser Art sind ausgearbeitet von M. WEGNER<sup>3</sup>, A. RÖHRIG<sup>4</sup> und V. HOTTENROTH<sup>5</sup>. A. HANAK<sup>6</sup> hat die Arbeiten von RÖHRIG und WEGNER allen praktischen Forderungen entsprechend zu einer Makro- und Mikrobestimmung der Ameisensäure ausgearbeitet. Als Halbmikromethode wird sie in folgender Weise ausgeführt:

Als Zersetzungsgefäß (Abb. 2 I) dient ein Reagensrohr gewöhnlicher Größe mit seitlich angeschmolzenem Glasröhrchen, das durch ein doppelt durchbohrten Gummi-

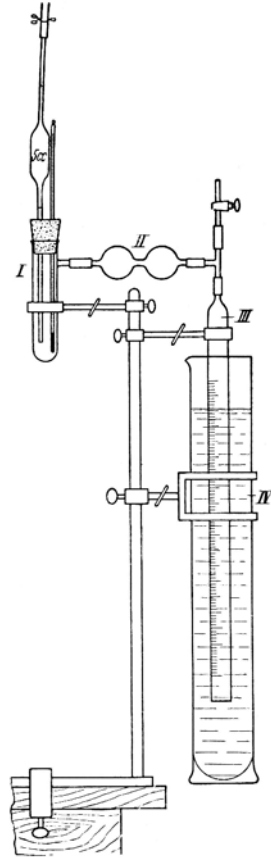


Abb. 2. Apparat zur Ameisensäurebestimmung nach A. HANAK.

<sup>1</sup> O. RIESSER: Zeitschr. physiol. Chem. 1916, 96, 355; Z. 1916, 32, 188.

<sup>2</sup> FR. WOHACK: Z. 1921, 42, 294.

<sup>3</sup> M. WEGNER: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 427.

<sup>4</sup> A. RÖHRIG: Z. 1910, 19, 1.

<sup>5</sup> V. HOTTENROTH: Chem.-Ztg. 1914, 38, 598. <sup>6</sup> A. HANAK: Z. 1930, 60, 403.



stopfen verschlossen werden kann, welcher eine 5 ccm-Pipette mit Schlauchstück und Quetschhahn und ein Thermometer trägt. An das Zersetzungsgefäß schließt ein Doppelkugelrohr (*II*) an, welches als Puffer wirkt und verhindert, daß das Gasvolumen, welches durch die Erwärmung und Abkühlung in der Apparatur hin- und herwandert, mit dem Wasser im Eudiometer in direkte Berührung kommt. Für eine Mikrobestimmung kann dieser Teil der Apparatur wegfallen bzw. durch ein einfaches Glasrohr ersetzt werden. Natürlich wird in diesem Falle das Zersetzungsgefäß auch möglichst klein gewählt. Das Kugelrohr ist mit einem T-Stück verbunden, das seinerseits wieder oben ein Hahnröhrchen trägt und unten ein Eudiometer (*III*) angeschlossen hat. Das Eudiometer ist von einem Mantelgefäß (*IV*) umgeben, welches mit einer Klemme so befestigt ist, daß die Oberfläche des Wassers innen und außen jeweils gleich hoch gestellt werden kann.

Zur Bestimmung der Ameisensäure, deren Menge zur Vermeidung zu großer Volumenzunahme nicht über 30 mg betragen soll, bringt man ihre Lösung in das Zersetzungsgefäß (*I*) und füllt die Pipette mit konz. Schwefelsäure genau bis zur Marke, wobei ein Anfassen des Glases vermieden wird. Hängende Tropfen werden abgestreift und der Stopfen auf das Zersetzungsgefäß aufgesetzt. Bisher ist der Hahn am T-Stück geöffnet. Sicherheitshalber wartet man 10 Minuten lang, damit sämtliche Teile des Apparates die Temperatur des Laboratoriumsraumes annehmen. Für die genaue Einhaltung dieser Anfangstemperatur bis auf 0,1° während der ganzen Dauer des Versuches ist Sorge zu tragen. Der Zylinder (*IV*) mit dem Wasser wird so hoch als möglich gehoben (natürlich nicht über die Einteilung des Eudiometers hinaus) und befestigt. Nun wird der Glashahn geschlossen und der Wasserstand am Eudiometer genau abgelesen. Durch vorsichtiges Öffnen des Quetschhahnes an der Pipette wird jetzt die Schwefelsäure bis zur unteren Marke einfließen gelassen. Das Volumen dieser ausfließenden Schwefelsäure wird in einem eigens vorgenommenen Versuch ein für allemal durch die verdrängte Luft bestimmt, da es bei der späteren Berechnung abgezogen werden muß. Während des Einfließens sorgt man durch Senkung des Wasserzylinders dafür, daß der Wasserspiegel innerhalb und außerhalb des Eudiometers ungefähr gleich hoch steht.

Ist im Zersetzungsgefäß ziemlich reines Natriumformiat vorhanden, so setzt die Zersetzung des Salzes sofort ein; andernfalls muß erst mit einer sehr kleinen Flamme vorsichtig erwärmt werden, damit Gasentwicklung eintritt. Man erwärmt die Schwefelsäure langsam bis auf 170° und stellt dann die Flamme fort. Ist von dem zu zersetzenden Salz während des Verdampfens der Lösung ein Teil hoch gegangen oder befinden sich über der Oberfläche der Schwefelsäure Spritzer davon, so wird nun durch vorsichtiges Schwenken des Gefäßes Benetzung mit der Schwefelsäure herbeigeführt. Nach wenigen Sekunden hat die Gasentwicklung aufgehört. Das Zersetzungsgefäß wird nun durch Darunterschieben eines Becherglases mit kaltem Wasser gekühlt, bis wieder ungefähr die ursprüngliche Temperatur der Laboratoriumsluft erreicht ist. Während der ganzen Zeit müssen die Flüssigkeitsspiegel innerhalb und außerhalb des Eudiometers angeglichen werden. Man trocknet nun das Zersetzungsgefäß von außen ab und läßt etwa 15 Minuten ruhig stehen. Danach muß das Thermometer unbedingt die gleiche Temperatur anzeigen, wie bei der ersten Ablesung des Eudiometerstandes. Darauf werden die Wasserspiegel genau gleichgestellt und das Volumen am Eudiometer abgelesen. Man zieht nun das der Schwefelsäure entsprechende Volumen ab und benutzt die durch die Kohlenoxydbildung ermittelte Volumenvermehrung zur Berechnung der zugehörigen Ameisensäure.

1 ccm Kohlenoxydgas entspricht 2,056 mg Ameisensäure. Da 0,05 ccm noch sicher abgelesen werden können, beträgt die Genauigkeit der Methode mehr als 0,1 mg Ameisensäure.

Das gefundene Volumen wird nach der bekannten Gleichung 
$$x = \frac{v(b-w) \cdot 0,0012469}{760(1+\alpha \cdot t)}$$
 auf 760 mm Druck und 0° umgerechnet. Darin bedeuten:

$v$  = Volumenzunahme, über Wasser gemessen,  
 $b$  = Barometerstand,  
 $w$  = Tension des Wassers bei der gemessenen Temperatur,  
 $\alpha$  = Ausdehnungskoeffizient der Gase (0,00367),  
 $t$  = Temperatur des Gases in Celsiusgraden,  
 0,0012469 = Gewicht von 1 ccm CO bei normalen Verhältnissen in g,  
 $x$  = CO in g.

Daraus ergibt sich  $\frac{46 \cdot x}{28} = g$  Ameisensäure.

Die unvermeidlichen Fehlerquellen dieser Methode ergeben sich aus Volumenänderungen, welche durch die eintretende Reaktion zwischen der einwirkenden Schwefelsäure und dem vorhandenen Salzmisch bedingt sind. So machen sich z. B. bei Gegenwart von Acetaten die entstehenden Essigsäuredämpfe störend bemerkbar. Diese Fehlerquellen sind jedoch so gering, daß sie praktisch nicht in Betracht kommen. Jedenfalls besitzt die Methode eine Genauigkeit, die von anderen Ameisensäurebestimmungen weder erreicht, geschweige denn übertroffen wird.

**γ) Sonstige Verfahren.** Die nachfolgenden beiden Verfahren, die auf allgemeinen Oxydationsreaktionen beruhen, sind nicht eindeutige Bestimmungsverfahren, können aber bei reinen Ameisensäurelösungen zur Bestimmung der Ameisensäure dienen.

**αα) Oxydation mit Kaliumpermanganat** nach A. HANAK und K. KÜRSCHNER<sup>1</sup> 20 ccm einer Lösung, die in 100 ccm etwa 0,05 g Ameisensäure als Natriumformiat und 1 g Natriumcarbonat enthält, wird mit 0,2 N.-Permanganatlösung im Überschuß (etwa 6,5 ccm) versetzt. Man läßt im Becherglase 45—60 Minuten bedeckt stehen, setzt 1 ccm 1%iger Zinksulfatlösung zu, füllt im Meßkolben auf 50 ccm auf, filtriert durch einen Porzellanfiltertiegel und benutzt 25 ccm des Filtrats zur colorimetrischen Ermittlung des noch vorhandenen Permanganats. Art des Colorimeters und Methode der Farbenvergleichung können beliebig gewählt werden. 1 ccm 0,2 N.-Permanganatlösung entspricht 2,76 mg Ameisensäure. Die Ermittlung des Permanganatüberschusses kann auch titrimetrisch erfolgen, jedoch ist die Rücktitration in saurer Lösung nicht unbedenklich.

**ββ) Bromometrische Bestimmung.** Ameisensäure wird durch Brom, wenn auch langsam, so doch quantitativ oxydiert im Sinne der Gleichung:



Nach H. MÄDER<sup>2</sup> bringt man 10 ccm der auf einen Gehalt von etwa 0,3% Ameisensäure verdünnten Lösung in eine gut schließende Glasstopfenflasche von etwa 300 ccm Inhalt, gibt je 50 ccm Kaliumbromid- und Kaliumbromatlösung (D.A.B.V.) hinzu, säuert mit 10 ccm officineller Phosphorsäure an und läßt gut verschlossen 12—15 Stunden am dunklen Ort stehen. Hierauf gibt man 1 g Kaliumjodid hinzu, schüttelt kräftig durch, säuert mit 10 ccm Salzsäure an und titriert nach 1—2 Minuten das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung (Indicator Stärkelösung). Die Anzahl verbrauchter ccm Thiosulfatlösung ist von 30 in Abzug zu bringen. Der Rest mal 0,0023 ergibt die in 10 ccm der angewandten Verdünnung enthaltene Menge von Ameisensäure.

## 2. Essigsäure.



Essigsäure ist eine stechend riechende Flüssigkeit mit brennbaren, blaß-blauen Dämpfen. Die wasserfreie Essigsäure erstarrt unterhalb + 16,5° zu farblosen, glänzenden Blättchen; sie ist mit Wasser, Alkohol und Äther in jedem Verhältnis mischbar. Spez. Gewicht 1,0543 (16°/4°), 1,04922 (20°/4°), Schmp. 17°, Siedepunkt 118°. Die Acetate sind meistens in Wasser löslich, schwer löslich ist nur das Silbersalz.

<sup>1</sup> A. HANAK u. K. KÜRSCHNER: Z. 1930, 60, 278. — Vgl. ferner J. A. FOUCHET: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1913, 9, 1110; C. 1918, I, 952. — H. GROSSMANN u. A. AUFRECHT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 2455. — J. KLEIN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 2640. — F. OBERHAUSER u. W. HENSINGER: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1927, 160, 366

<sup>2</sup> H. MÄDER: Apoth.-Ztg. 1912, 27, 746. In ähnlicher Weise verfahren auch A. F. JOSEPH (Journ. Soc. chem. Ind. 1910, 29, 1189; Z. 1912, 23, 226) und E. RUPP (Arch. Pharm. 1905, 243, 69).

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an Essigsäure folgende Reinheitsanforderungen:

Erhitzt man eine Mischung von 1 ccm Essigsäure und 3 ccm Natriumhypophosphitlösung  $\frac{1}{4}$  Stunde lang im siedenden Wasserbade, so darf sie keine dunklere Färbung annehmen (Arsenverbindungen). Die wäßrige Lösung (1 + 19) darf weder durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure), noch durch Silbernitratlösung (Salzsäure), noch durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Schwermetallsalze) verändert werden. — Wird 1 ccm Essigsäure mit einer Lösung von 2 g Natriumcarbonat in 10 ccm Wasser und mit 5 ccm Quecksilberchloridlösung  $\frac{1}{2}$  Stunde lang im siedenden Wasserbade erhitzt, so darf weder Trübung noch Abscheidung eines Niederschlages eintreten (Ameisensäure, Acetaldehyd). — Eine Mischung von 6 ccm Essigsäure, 14 ccm Wasser und 1 ccm Kaliumpermanganatlösung darf die rote Farbe innerhalb 1 Stunde nicht verlieren (Schweflige Säure, empyreumatische Stoffe, Ameisensäure).

### a) Nachweis.

**α) Erkennung am Geruch.** Verd. Schwefelsäure setzt die Essigsäure aus ihren Salzen in Freiheit ebenso konz. Schwefelsäure. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Alkohol bildet sich Essigäther, leicht an dem angenehmen, obstartigen Geruch zu erkennen. Die Reaktion führt man nach D. KRÜGER und E. TSCHIRCH<sup>1</sup> am besten in folgender Weise aus: Man bereitet sich zunächst durch Mischen gleicher Volumen Äthylalkohol und konz. Schwefelsäure Äthylschwefelsäure. Etwa 3 ccm dieses Gemisches gießt man über das in einem Reagensglas befindliche Salz, erwärmt vorsichtig kurze Zeit und schließt dann das Röhrchen lose mit einem passenden Stopfen. Bei Gegenwart von Essigsäure wird nach etwa 5 Minuten der charakteristische Geruch des Äthylacetats auftreten. Die Empfindlichkeit der Reaktion ist gering. In Gegenwart von Nitraten versagt die Reaktion.

Erhitzt man das trockene Alkalisalz mit Arsenigsäureanhydrid im Reagensglas, so entstehen übelriechende Dämpfe von Kakodyl  $As_2(CH_3)_4$  und Kakodyloxid  $As_2(CH_3)_4O$ . Butter- und Valeriansäure geben ähnliche Reaktionen. Die freie Säure muß erst neutralisiert und dann eingengt werden.

**β) Farbreaktionen.** Mit anorganischen Ferrisalzen gibt Essigsäure eine blutrote Färbung, die auf der Entstehung des Monoacetates der Hexa-acetato-triferribase beruht. Beim Erhitzen verschwindet die Rotfärbung unter Abscheidung eines basischen Salzes. Die Empfindlichkeit der Reaktion ist jedoch nach L. J. CURTMANN und B. R. HARRIS<sup>2</sup> außerordentlich gering.

Wird eine wäßrige Lösung von o-Phthalaldehyd,  $C_6H_4(CHO)_2$ , mit etwas Ammoniak versetzt und mit Essigsäure angesäuert, so färbt sich die Flüssigkeit tief dunkelviolet, und gleich darauf scheidet sich unter Entfärbung der Flüssigkeit ein tief blauschwarzer, voluminöser Niederschlag aus<sup>3</sup>.

**γ) Nachweis nach St. R. BENEDICT<sup>4</sup>.** Die Reaktion beruht darauf, daß durch den Zusatz einer neutralen Acetatlösung die Dissoziation der Essigsäure soweit zurückgedrängt wird, daß die Wasserstoffionenkonzentration nicht mehr genügt, um Kobaltosulfid in Lösung zu halten.

Die zu prüfende, von Kationen außer den Alkalien befreite Lösung wird mit Natriumcarbonat neutralisiert bzw. schwach alkalisch gemacht, mit überschüssiger Silbernitratlösung versetzt und der Niederschlag abfiltriert. Zur Entfernung des überschüssigen Silbers wird das neutrale Filtrat mit etwas N.-Natriumchloridlösung versetzt, filtriert und mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Gibt man jetzt zu der Lösung eine mit Schwefelwasserstoff gesättigte Lösung

<sup>1</sup> D. KRÜGER u. E. TSCHIRCH: Chem.-Ztg. 1930, 54, 42.

<sup>2</sup> L. J. CURTMANN u. B. R. HARRIS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1917, 39, 1315; C. 1918, I, 660.

<sup>3</sup> THEILE u. WINTER: Liebigs. Ann. 1907, 311, 353.

<sup>4</sup> St. R. BENEDICT: Amer. Chem. Journ. 1904, 32, 480; C. 1905, I, 122.

von 2 ccm N.-Kobaltnitratlösung, die mit 2—3 Tropfen N.-Essigsäure angesäuert wurde, so entsteht ein schwarzer Niederschlag von Kobaltosulfid, wenn die zu prüfende Flüssigkeit Essigsäure bzw. Acetate enthält.

Bei der großen Empfindlichkeit der Reaktion gegen kleine Mengen von Salzen, deren Gegenwart eine Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration herbeiführt, darf nach D. KRÜGER und E. TSCHIRCH<sup>1</sup> bei einem positiven Ausfall nur mit größter Vorsicht auf das Vorhandensein von Acetaten geschlossen werden.

d) **Nachweis nach D. KRÜGER und E. TSCHIRCH<sup>2</sup>.** 1—3 ccm der auf Essigsäure zu prüfenden neutralen Lösung werden mit 1 ccm 0,02 N.-Jodlösung, 1 ccm 5%iger Lanthannitratlösung und einigen Tropfen N.-Ammoniak versetzt und, wenn in der Kälte keine Blaufärbung eintritt, langsam bis nahe zum Sieden erwärmt. Bei Gegenwart von Acetat bildet sich ein blaues Sol und beim Erhitzen blaue Flocken. Empfindlichkeit 0,1 mg Essigsäure. Organische Anionen stören die Reaktion erheblich. Schwefelsäure und Phosphorsäure müssen vorher entfernt werden.

e) **Mikrochemischer Nachweis der Essigsäure nach D. KRÜGER und E. TSCHIRCH<sup>3</sup>.** Zum Nachweis freier Essigsäure bringt man an einen Tropfen der Lösung ein Kryställchen Uranylformiat, an die andere Seite ein Kryställchen Natriumformiat. Acetate trocknet man auf dem Objektträger ein und bringt darauf einen Tropfen des Reagens. Bei Gegenwart von Essigsäure tritt sofort oder spätestens nach einer Minute Bildung von tetraederischen Krystallen ein.

Uranylformiat wird hergestellt durch Auflösen von 10 g Uranylnitrat (kryst.) in etwa 500 ccm Wasser, wozu in geringem Überschuß Ammoniak gesetzt wird. Der Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, mit heißem Wasser kurz ausgewaschen und mit Ameisensäure übergossen. Das Filtrat wird in einer Porzellanschale aufgefangen und eingedampft, wobei man ein feines krystallines hellgelbes Pulver erhält.

Der mikrochemische Nachweis mittels dieses Salzes übertrifft nicht nur die meisten makroskopischen Methoden an Genauigkeit, sondern er ist auch durchaus eindeutig. Im Gegensatz zu anderen Acetatreaktionen ermöglicht dieser Nachweis auch die Unterscheidung der Essigsäure von ihren nächsten Homologen und Erkennung neben diesen.

ζ) **Nachweis von Essigsäureanhydrid.** αα) Nach G. HELLER und W. TISCHNER<sup>4</sup>. Ein 5—7,5 mm weites Glasrohr wird zu einem doppelten U-Rohr gebogen, etwa 0,2 g Substanz in die eine Biegung eingefüllt und an dieser Seite das Rohr zugeschmolzen, im Ölbad langsam auf 155° erhitzt und bei dieser Temperatur einige Zeit gehalten. Die andere Biegung der Röhre taucht in eine Kältemischung und enthält nach Beendigung des Erhitzens das abdestillierte Anhydrid. Das Rohr wird durchschnitten und das Kondensat mit etwa 2 ccm einer p-Amidobenzoessäurelösung durchgeschüttelt, die aus der Amidosäure unter Zusatz von 20 Tln. Wasser und möglichst wenig Salzsäure dargestellt war. Die Flüssigkeit wird in einem Kölbchen nach 2 Minuten mit einigen Tropfen Natriumacetat-lösung versetzt, worauf beim Reiben und Abkühlen die Krystallisation beginnt. Nach mehreren Stunden wird wieder mit Salzsäure angesäuert und die Krystalle von p-Acetamino-benzoessäure, die bei 253—254° schmelzen, werden abfiltriert.

ββ) Für den Nachweis von Essigsäureanhydrid in Essig empfehlen M. G. EDWARDS und K. J. P. ORTON<sup>5</sup> das 2,4-Dichloranilin. Siehe die Bestimmung S. 1085.

<sup>1</sup> D. KRÜGER u. E. TSCHIRCH: Chem.-Ztg. 1930, 54, 42.

<sup>2</sup> D. KRÜGER u. E. TSCHIRCH: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1929, 62, 2776.

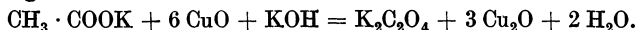
<sup>3</sup> D. KRÜGER u. E. TSCHIRCH: Pharm. Ztg. 1929, 74, 1096; Mikrochemie 1929, 7, 318.

<sup>4</sup> G. HELLER u. W. TISCHNER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1910, 43, 2574.

<sup>5</sup> Siehe Fußnote 1 auf S. 1085.

### b) Bestimmung.

α) Eindeutige Verfahren für die Bestimmung der Essigsäure sind bisher nicht bekannt geworden. Neuerdings haben aber M. MUGDAN und J. WIMMER<sup>1</sup> ein Verfahren beschrieben, das auf der Erhitzung der Acetate mit Kaliumhydroxyd und Kupferoxyd beruht, wobei die Acetate zu Oxalaten nach der Gleichung



oxydiert werden und bei dem nur Propion- und Buttersäure störend wirken. Anorganische Säuren und Ameisensäure stören nicht. Bei Gegenwart von höheren Homologen der Essigsäure, Weinsäure usw. wird aus der zu untersuchenden Substanz die Essigsäure zunächst mit Phosphorsäure abdestilliert und das Destillat nach dem Eindampfen mit Kalilauge mit Kaliumhydroxyd und Kupferoxyd geschmolzen.

Etwa 1 g Acetat wird mit etwa 10 g Kaliumhydroxyd (10—20% Wasser enthaltend) und 8 g Kupferoxydpulver in einem Reagensglase aus Jenaer Glas in einem Ölbad von 220—240° 10—15 Minuten unter zeitweiligem Umrühren mit einem Glasstabe oder einem Kupferdraht erhitzt. Die abgekühlte Schmelze wird unter Erwärmen in Wasser gelöst, filtriert und auf 1000 ccm aufgefüllt. In 100 ccm der Lösung wird nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung titriert. 2 Äquivalente Kaliumpermanganat entsprechen 1 Mol Essigsäure.

Bei Gegenwart von Calcium wird die Lösung der Schmelze vor dem Filtrieren mit etwas Natriumcarbonat aufgeköcht und bei Gegenwart von Sulfiten die filtrierte Lösung mit Wasserstoffsuperoxyd gekocht und das letztere unter Zufügen einer Spur Silbersalz zerstört. Ist freie hochprozentige Essigsäure zu untersuchen, so wird diese in einer Glaskugel oder unter Anwendung einer Wägebipette in das bis oben mit Eis gekühlte Reagensglas gebracht und mit Kaliumhydroxyd und Kupferoxyd versetzt. Ist die Essigsäure verdünnt, so wird sie vorher im Reagensglase mit Kaliumhydroxyd überneutralisiert und darauf wird eingekocht. Etwa in der Substanz schon vorhandene Oxalsäure wird vorher als Calciumsalz entfernt.

Gehaltsbestimmung von Eisessig durch Ermittlung des Erstarrungspunktes nach C. O. HARVEY<sup>2</sup>. Nach HARVEY soll die Bestimmung des Gehaltes von Eisessig durch Ermittlung des Erstarrungspunktes genauere Werte ergeben als die Titration, da letztere zumeist infolge Gegenwart von Spuren von Ameisensäure zu hohe Werte anzeigt. Der Erstarrungspunkt wird folgendermaßen festgelegt: Eine Probe der zu untersuchenden Säure wird in einer Kältemischung abgekühlt und nach Unterkühlung zum Erstarren gebracht. Hat man so den Erstarrungspunkt annähernd bestimmt, so unterwirft man eine zweite Probe der Abkühlung im Wasserbade, dessen Temperatur 5° unter dem bei der ersten Bestimmung gefundenen Näherungswert liegt. Die Säure wird um 1° unterkühlt, dann das Thermometer, das bei der ersten Bestimmung verwendet war, schnell eingetaucht, so daß Krystallbildung eintritt. Aus dem annähernd linearen Verlauf der Kurve von Erstarrungspunkt und Gehalt läßt sich der Säuregehalt aus der Formel  $x = 0,64 t + 89,5$  berechnen.  $t$  bedeutet die Erstarrungstemperatur.

H. DROOP RICHMOND und E. H. ENGLAND<sup>3</sup> schlagen zur Gehaltbestimmung des Eisessigs die Ermittlung des Spez. Gewichtes und des Erstarrungspunktes vor. Der Zusammenhang zwischen Spez. Gewicht, Erstarrungspunkt und dem Essigsäuregehalt von Eisessig ist aus der Tabelle 4 auf S. 1085 ersichtlich. Ein Gehalt des Eisessigs an 1% Propionsäure bewirkt eine Erniedrigung des Spez. Gewichtes von durchschnittlich 0,00065 und eine Erstarrungsdepression von 0,485°.

Die Bestimmung des Erstarrungspunktes soll so vorgenommen werden, daß die zu prüfende Säure um 1° unterkühlt wird. Stärkeres Unterkühlen ergibt fehlerhafte Resultate. Um die Einwirkung von Feuchtigkeit zu vermeiden, nimmt man zweckmäßig eine größere Probe von etwa 100 ccm für die Untersuchung.

<sup>1</sup> M. MUGDAN u. J. WIMMER: Zeitschr. angew. Chem. 1933, **46**, 117.

<sup>2</sup> C. O. HARVEY: Analyst 1926, **51**, 238; Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **77**, 221.

<sup>3</sup> H. DROOP RICHMOND u. E. H. ENGLAND: Analyst 1926, **51**, 283; Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **77**, 222.

Tabelle 4. Gefrierpunkte und Spez. Gewichte von Eisessig.

| Säure % | 0               | 0,1             | 0,2             | 0,3             | 0,4             | 0,5             | 0,6             | 0,7             | 0,8             | 0,9             |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 99      | 14,74<br>1,0582 | 14,92<br>1,0580 | 15,10<br>1,0577 | 15,28<br>1,0574 | 15,47<br>1,0572 | 15,65<br>1,0569 | 15,84<br>1,0566 | 16,04<br>1,0564 | 16,24<br>1,0561 | 16,43<br>1,0558 |
| 98      | 13,12<br>1,0606 | 13,27<br>1,0604 | 13,43<br>1,0602 | 13,58<br>1,0599 | 13,74<br>1,0596 | 13,90<br>1,0594 | 14,06<br>1,0592 | 14,23<br>1,0589 | 14,40<br>1,0587 | 14,57<br>1,0584 |
| 97      | 11,68<br>1,0627 | 11,82<br>1,0625 | 11,96<br>1,0623 | 12,10<br>1,0621 | 12,24<br>1,0619 | 12,38<br>1,0617 | 12,52<br>1,0615 | 12,67<br>1,0613 | 12,82<br>1,0611 | 12,97<br>1,0608 |
| 96      | 10,34<br>1,0646 | 10,47<br>1,0644 | 10,61<br>1,0642 | 10,74<br>1,0641 | 10,87<br>1,0639 | 11,0<br>1,0637  | 11,14<br>1,0635 | 11,27<br>1,0633 | 11,40<br>1,0631 | 11,54<br>1,0629 |
| 95      | 9,08<br>1,0663  | 9,20<br>1,0661  | 9,32<br>1,0660  | 9,45<br>1,0658  | 9,57<br>1,0657  | 9,70<br>1,0655  | 9,82<br>1,0653  | 9,95<br>1,0651  | 10,08<br>1,0650 | 10,21<br>1,0648 |
| 94      | 7,83<br>1,0677  | 7,95<br>1,0676  | 8,08<br>1,0674  | 8,20<br>1,0673  | 8,33<br>1,0671  | 8,46<br>1,0670  | 8,58<br>1,0669  | 8,70<br>1,0667  | 8,83<br>1,0666  | 8,95<br>1,0664  |
| 93      | 6,67<br>1,0689  | 6,78<br>1,0688  | 6,89<br>1,0687  | 7,01<br>1,0685  | 7,13<br>1,0684  | 7,24<br>1,0683  | 7,36<br>1,0682  | 7,48<br>1,0681  | 7,59<br>1,0679  | 7,71<br>1,0678  |
| 92      | 5,57<br>1,0699  | 5,67<br>1,0698  | 5,78<br>1,0697  | 5,89<br>1,0696  | 6,00<br>1,0695  | 6,11<br>1,0694  | 6,22<br>1,0693  | 6,33<br>1,0692  | 6,45<br>1,0691  | 6,56<br>1,0690  |
| 91      | 4,25<br>1,0708  | 4,62<br>1,0707  | 4,72<br>1,0706  | 4,83<br>1,0705  | 4,93<br>1,0704  | 5,04<br>1,0704  | 5,14<br>1,0703  | 5,25<br>1,0702  | 5,35<br>1,0701  | 5,46<br>1,0700  |
| 90      | 3,51<br>1,0716  | 3,61<br>1,0715  | 3,71<br>1,0715  | 3,81<br>1,0714  | 3,91<br>1,0713  | 4,01<br>1,0712  | 4,11<br>1,0711  | 4,21<br>1,0710  | 4,32<br>1,710   | 4,42<br>1,0709  |

Zwischen 95 und 100% besteht die folgende Beziehung zwischen Gefrierpunkt und Spez. Gewicht:  $(16,63 - \text{Gefrierpunkt}) 0,00144 = \text{Spez. Gewicht} - 1,0555$ . — Die Fehlergrenze übersteigt 0,1 bzw. 0,0001 nicht.

3) **Bestimmung von Essigsäureanhydrid.** M. G. EDWARDS und K. J. P. ORTON<sup>1</sup> empfehlen zur Bestimmung von Essigsäureanhydrid in Essigsäure folgendes Verfahren: 100 ccm der Essigsäure läßt man mit 2 g (oder mehr) 2,4-Dichloranilin mehrere Stunden bei 16° stehen, wobei etwa vorhandenes Essigsäureanhydrid sehr schnell in Dichloranilid übergeführt wird, ohne daß eine Acetylierung durch die Essigsäure eintritt. Man verdünnt auf 20% Essigsäure, zieht mit Chloroform aus und wäscht die Chloroformlösung zur Entfernung überschüssigen Anilins mit Salzsäure (10%). Das im Chloroform verbliebene Dichloranilid wird mittels Chlorkalks und Essigsäure (50%) in das Chloramin verwandelt<sup>2</sup> und letzteres jodometrisch bestimmt.

### 3. (n-)Buttersäure.



(n-)Buttersäure ist eine dicke, aufdringlich riechende, mit Wasserdämpfen flüchtige Flüssigkeit vom Siedepunkte 163,5°. Spez. Gewicht (20/5°): 0,9590. Mit Wasser und Alkohol mischbar; aus der wäßrigen Lösung durch Calciumchlorid aussalzbar. Das Calciumbutyrat ist bei 65—68° in Wasser schwerer löslich als in der Kälte; eine bei 20° gesättigte Lösung trübt sich daher beim Erhitzen. Das Mercurobutyrat ist schwer löslich.

<sup>1</sup> M. G. EDWARDS u. K. J. P. ORTON: Journ. Chem. Soc. London 1911, **99**, 1181; C. 1911, II, 528. — Vgl. auch W. S. CALCOTT, F. L. ENGLISH u. O. C. WILBUR: Ind. Engin. Chem. 1925, **17**, 942; C. 1926, II, 802.

<sup>2</sup> K. J. P. ORTON u. W. J. JONES: Journ. Chem. Soc. London 1909, **95**, 1456; C. 1909, II, 1221.

## a) Nachweis.

α) **Nachweis durch den Geruch.** Buttersäure kann nach J. GROSSFELD und F. BATTAY<sup>1</sup> durch den Geruch selbst noch in sehr geringer Konzentration erkannt werden. Sind keine anderen stärker riechenden Stoffe vorhanden, so können noch 10 mg freie Buttersäure in 100 ccm Flüssigkeit wahrgenommen werden. Sind solche vorhanden, so kann man sie meistens durch Einwirkung von Kaliumpermanganat zerstören, eine Behandlung, der die Buttersäure als gesättigte Fettsäure in der Kälte widersteht. Zu diesem Zwecke empfiehlt es sich, 100 ccm der auf Buttersäure zu prüfenden Lösung mit 20 ccm 1% iger Kaliumpermanganatlösung zu versetzen und dann nach Zugabe von 1 ccm N.-Natronlauge eine zeitlang stehen zu lassen.

β) **Nachweis als Calciumsalz<sup>2</sup>.** Die kalt gesättigte Lösung des Calciumbutyrats trübt sich beim Erwärmen und wird beim Erkalten wieder klar. Die geringste Löslichkeit liegt bei 65—80°.

γ) **Nachweis durch das Kupfersalz<sup>3</sup>.** Nach H. AGULHON versetzt man eine gegen Phenolphthalein neutrale Natriumbutyratlösung mit wenig<sup>4</sup> Kupfersulfatlösung und schüttelt die Flüssigkeit mit Äther, Essigäther, Chloroform oder Amylalkohol; bei einer Konzentration des Butyrats bis 2% geht das Kupferbutyrat mit blauer Farbe in die Lösungsmittel über, wobei sich die wäßrige Lösung entfärbt.

Die Kupfersalze der Ameisen- und Essigsäure gehen nicht in die Lösungsmittel über, das der Propionsäure geht zum geringen Teil in Essigäther über; in den übrigen Lösungsmitteln ist es unlöslich, Die Kupfersalze der Valerian- und Capronsäure verhalten sich wie das Butyrat.

δ) **Nachweis nach L. KLINC<sup>5</sup>.** Das Verfahren beruht auf der Oxydation der Buttersäure zu Aceton in schwefelsaurer Lösung mittels Wasserstoffsperoxyds in Gegenwart von Ferriammoniumsulfat als Katalysator. Das Aceton wird mit dem SCOTT-WILSONSchen Reagens (alkalische Mercuricyanid- und Silbernitratlösung) nachgewiesen, mit dem Aceton eine unlösliche Verbindung gibt.

SCOTT-WILSONSches Reagens. Man stellt getrennte Lösungen von 10 g Mercuricyanid und 180 g Natriumhydroxyd in je 600 ccm Wasser her, vereinigt beide Lösungen nach dem Erkalten und setzt langsam eine Lösung von 2,9 g Silbernitrat in 400 ccm Wasser hinzu. Vor dem Gebrauch läßt man die Lösung einige Tage stehen, damit etwa entstehende Trübungen sich vollkommen absetzen können.

Ausführung. 1—5 ccm der auf Buttersäure zu prüfenden Lösung werden in einem unten kolbig erweiterten Probierrohr<sup>6</sup> mit 3 ccm schwefelsaurer Ferriammoniumsulfatlösung (1,5 g Ferriammoniumsulfat in 1 l 2 N.-Schwefelsäure), 5 ccm Wasserstoffsperoxydlösung (3%) — das Volumen des Reaktionsgemisches soll 10 ccm möglichst nicht überschreiten — mit 1—2 Glaskügelchen versetzt. Das Probierrohr wird mittels eines Gummistopfens — nicht Korkstopfens — mit einem engrohrigen Kühler verschlossen und auf einem Drahtnetz erhitzt und das Reaktionsgemisch bis auf etwa 1 ccm abdestilliert<sup>7</sup>. Als Vorlage dient

<sup>1</sup> J. GROSSFELD u. F. BATTAY: Z. 1931, 61, 129.

<sup>2</sup> H. MEYER: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen. Berlin: Julius Springer 1933.

<sup>3</sup> H. AGULHON: Bull. Soc. chim. France [4] 13, 404; C. 1913, II, 86.

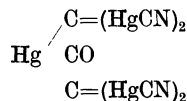
<sup>4</sup> Die Menge des zugesetzten Kupfersulfates darf nicht größer sein, als der Bildung des neutralen Salzes entspricht; die basischen Kupfersalze sind in den genannten Lösungsmitteln unlöslich.

<sup>5</sup> L. KLINC: Biochem. Zeitschr. 1934, 273, 1.

<sup>6</sup> Das Probierrohr soll 18 cm lang, 1,8 cm weit sein und die kolbige Erweiterung soll 35 ccm fassen.

<sup>7</sup> Der Destillationsapparat ist der gleiche wie in Abb. 4 (S. 1089), jedoch unter Fortfall des Kolbens B.

ein Reagensglas mit 5 ccm SCOTT-WILSONSchem Reagens. Das beim Vorhandensein von Buttersäure überdestillierende Aceton gibt mit dem Reagens eine unlösliche weiße Acetonquecksilberverbindung von nebenstehender Zusammensetzung, wenn mehr als 0,5 mg Buttersäure vorhanden waren; bei 0,05—0,5 mg entsteht eine hellblaue bis weiße Trübung und bei 0,009—0,05 mg eine blaue Opalescenz. Das Maximum der Reaktion ist erst nach 10 Minuten erreicht.



Bei der Oxydation von Buttersäure mit Wasserstoffsperoxyd entstehen neben Aceton auch geringe Mengen Acetaldehyd; bei Gegenwart von Propionsäure entstehen größere Mengen davon, so daß die Reaktion nicht ausführbar ist. Ameisensäure bis 200 mg stört die Reaktion nicht. Essigsäure bildet Spuren von Formaldehyd, der in dem Quecksilberreagens eine graue Trübung verursacht. Milchsäure stört die Bestimmung geringster Buttersäuremengen.

Die Gegenwart von Bromiden, Jodiden, Sulfiden macht die Reaktion unbrauchbar; Chloride, Sulfite, Nitrite, Silber, Quecksilber sowie größere Mengen Eisen stören die Reaktion. Die Reagenzien, auch der etwa zur Extraktion verwendete Äther, müssen auf Reinheit geprüft und nötigenfalls gereinigt werden.

Bei Gegenwart von Ameisen-, Essig-, Propion- und Milchsäure verfährt man, wie folgt: Die Buttersäure wird zunächst durch Destillation von störenden Beimengungen befreit. Dann wird ein Leerversuch mit den Reagenzien angestellt, wobei man 3 ccm Ferriammoniumsulfatlösung und 5 ccm Wasserstoffsperoxydlösung verwendet. Eine etwa dabei eintretende Trübung mit dem Quecksilberreagens ist in Abzug zu bringen. Das Volumen der Buttersäurelösung, die keine Iso- und Oxybuttersäure enthalten darf, soll 5 ccm nicht übersteigen und der Gesamtsäuregehalt soll 100 mg, ausgedrückt als Buttersäure, zweckmäßig nicht überschreiten. Die Probe kommt in das Probierrglas A der Apparatur<sup>2</sup>, wird mit 3 ccm Ferriammoniumsulfat- und 5 ccm Wasserstoffsperoxydlösung versetzt und oxydiert. Bleibt das vorgelegte Quecksilberreagens unverändert, so ist Buttersäure nicht vorhanden. Trübt sich das Reagens, so kann Buttersäure vorhanden sein; es kann aber eine weiße Trübung auch durch Propionsäure, eine graue auch durch Propion- oder Milchsäure oder durch große Mengen Essigsäure verursacht sein. Um darüber zu entscheiden, versetzt man das Destillat mit der erhaltenen Trübung mit 5 ccm Wasserstoffsperoxydlösung und redestilliert in dem Apparat Abb. 4 (S. 1089). Ist Buttersäure vorhanden, so erscheint im Quecksilberreagens eine weiße Trübung oder ein weißer Niederschlag oder eine blaue Fluorescenz.

ε) **Nachweis nach G. DENIGES<sup>1</sup>.** Der Nachweis gelingt in einfacher Weise durch Überführung der Buttersäure in Acetessigsäure mittels Wasserstoffsperoxyds in Gegenwart eines Eisensalzes als Katalysator und deren Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium.

Zu 5 ccm der auf Buttersäure zu prüfenden Lösung setzt man unter jedesmaligem Umschütteln 5 ccm Wasserstoffsperoxydlösung (0,01 Vol.-%) für 0,01 g Buttersäure und 1 ccm Ferroammoniumsulfatlösung (5 g Ferroammoniumsulfat, 10 ccm 10 vol.-%ige Schwefelsäure auf 100 ccm mit Wasser verdünnt) hinzu, bringt 5 Minuten in ein Wasserbad von 68—70°, gibt dann 6 Tropfen Natronlauge hinzu, und filtriert nach völligem Erkalten unter fließendem Wasser. Zu 5—6 ccm des Filtrates setzt man 3 Tropfen Natronlauge, 3 Tropfen einer 5%igen Natriumnitroprussidlösung, schüttelt um und übersättigt mit mindestens 0,5 ccm Eisessig. Den vorhandenen Mengen Buttersäure entsprechend, tritt eine rosa bis intensiv rote Farbe auf.

Zur Prüfung der käuflichen Buttersäure verdünnt man 1 Tropfen mit 5 ccm Wasser, gibt 5 ccm 5—6 vol.-%iger Wassersperoxydlösung hinzu und verfährt wie oben.

Nach F. BAMFORD<sup>2</sup> ist die Reaktion nach DENIGES nicht spezifisch für Buttersäure, sondern wird auch von deren höheren Homologen gegeben.

ζ) **Mikrochemischer Nachweis<sup>3</sup>.** Zu diesem Nachweis eignet sich das Cupributyrat. Bringt man Cupricarbonat in eine einigermaßen konz. wäßrige

<sup>1</sup> G. DENIGES: Ann. Chim. analyt. appl. 1918, 23, 27; C. 1918, I, 1073.

<sup>2</sup> F. BAMFORD: Analyst 1924, 49, 226.

<sup>3</sup> BEHRENS-KLEY: Organische mikrochemische Analyse S. 319, 1922. — EMICH: Mikrochemie 1926, 211. — KLEIN u. WENZL: Mikrochemie 1932, 11, 99.



Buttersäurelösung oder fügt man Cuprinitrat zu einer konz. Lösung von Calciumbutyrat, so entsteht ein lebhaft grüner, flockiger Niederschlag. Beim Erwärmen verdünnterer Lösungen scheidet sich die Verbindung als grünes Öl ab. Zusatz von Alkohol beschleunigt die Krystallbildung. Die Krystalle sind lebhaft grün und sehr wenig dichroitisch. Mit einem Überschuß von Kupfercarbonat entstehen nicht krystallisierende basische Salze.

Von anderer Seite werden auch das Silbersalz<sup>1</sup> und das Anilid<sup>2</sup> zum Nachweise empfohlen.

### b) Bestimmung.

α) Bestimmung nach L. KLINC<sup>3</sup>. Das Verfahren zum Nachweis (S. 1086) ist auch zur Bestimmung der Buttersäure, auch in kleinsten Mengen, verwendbar.

Bei Mengen von 5—20 mg führt man die Bestimmung nach dem Makroverfahren jodometrisch aus, bei geringeren Mengen nach dem Mikroverfahren und zwar bei 0,05—5 mg ebenfalls jodometrisch und bei 0,009—0,06 mg nephelometrisch. Welches dieser Verfahren zu wählen ist, ergibt sich aus dem qualitativen Nachweis.

αα) Makrobestimmung. In die beiden mit Eis gekühlten Vorlagen der Apparatur (Abb. 3) gibt man je 80 ccm auf 1° abgekühltes Wasser und in den Destillierkolben die Buttersäurelösung (nicht über 20 ccm mit 2—20 mg Buttersäure). Dann fügt man 3 ccm Ferriammoniumsulfatlösung (S. 1086) und je mg Buttersäure etwa 0,1 ccm 3%ige Wasserstoffsuperoxydlösung (S. 1086) — ein kleiner Überschuß muß vorhanden sein und wirkt nicht schädlich — hinzu, schließt mit einem starken Quetschhahn den Gummischlauch des Wasserdampfeinleitungsrohres und setzt unter den Destillierkolben das vorher zum Sieden erhitzte Wasserbad. 2 Minuten darauf verbindet man den Gummischlauch des Einleitungsrohres mit dem Dampfentwickler, öffnet den Quetschhahn und sorgt für eine möglichst gleichmäßige langsame Destillation, wobei man das Wasserbad etwas erwärmt und die Destillation so leitet, daß die obere Erweiterung des Destillationsgefäßes nach

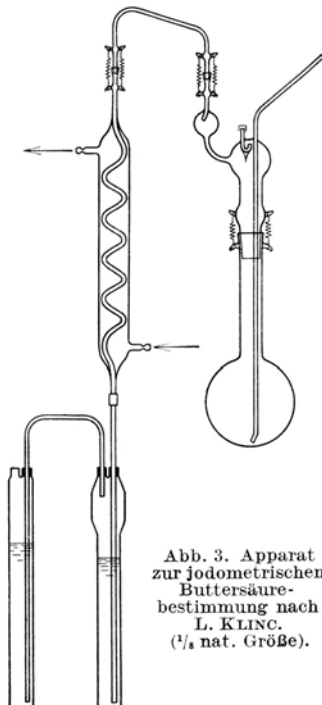


Abb. 3. Apparat zur jodometrischen Buttersäurebestimmung nach L. KLINC. (1/3 nat. Größe).

5—8 Minuten heiß ist und nach weiteren 6—10 Minuten der Wasserdampf den oberen Teil des Kühlers erreicht hat. Man muß darauf achten, daß der obere Teil des Kühlers gleichmäßig heiß bleibt, andererseits aber möglichst wenig — nicht über 50 ccm — Wasser in die Vorlage überdestilliert. Nach 40 bis 50 Minuten unterbricht man die Destillation, spült den Kühler in einen 500 ccm-ERLENMEYER-Kolben ab und fügt den Inhalt der beiden Vorlagen hinzu. Dann versetzt man die Flüssigkeit mit 5 ccm Natronlauge (40%) und sofort mit einem Überschuß von 0,02 N.-Jodlösung (auf 10 mg Buttersäure 50 ccm Jodlösung in Kaliumjodid), läßt 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, säuert mit Salzsäure (1:1) an und titriert mit 0,02 N.-Natriumthiosulfatlösung das unverbrauchte Jod zurück. Gleichzeitig bestimmt man mit 250 ccm gutgekühltem

<sup>1</sup> KLEIN u. WENZL: Mikrochemie 1932, 11, 99.

<sup>2</sup> KLEIN u. WENZL: Mikrochemie 1931, 10, 81.

<sup>3</sup> L. KLINC: Biochem. Zeitschr. 1934, 273, 1.

Wasser und den gleichen Mengen Natronlauge, Jodlösung und Salzsäure den Wirkungswert der Jodlösung. Den bei einem Leerversuch gewöhnlich gefundenen Verbrauch von 0,2 ccm 0,02 N.-Jodlösung bringt man von der im Hauptversuch verbrauchten Jodlösung in Abzug. Mit Rücksicht darauf, daß die Jodoform bildenden Produkte, als Aceton berechnet, 65% des theoretischen Wertes ergeben, entspricht 1 ccm 0,02 N.-Jodlösung, 0,451 mg Buttersäure.

Innerhalb der Grenzen von 2—20 mg Buttersäure beträgt der absolute Fehler 0,5%. Wenn man abweichend arbeitet, können sowohl Aceton als auch namentlich Acetaldehyd weiter oxydiert werden und andererseits kann auch Acetaldehyd aus den Vorlagen entweichen.

$\beta\beta$ ) Mikrobestimmungen. Bei diesen Bestimmungen muß das Aceton durch Redestillation von dem bei der Oxydation gleichzeitig entstandenen Acetaldehyd getrennt werden. Man verfährt zunächst wie bei dem qualitativen Nachweis (S. 1086) und führt dann die Entfernung des Acetaldehyds durch Oxydation in alkalischer Lösung mit Wasserstoffsperoxyd aus, wobei das Aceton aus seiner Quecksilberverbindung wieder frei gemacht wird.

Bei der nephelometrischen Bestimmung von 0,009—0,06 mg Buttersäure bringt man die beim qualitativen Nachweis erhaltene opalisierende alkalische SCOTT-WILSONSche Quecksilberreagenslösung in den Kolben *A* der Apparatur (Abb. 4) und destilliert dessen Inhalt nach Zusatz von 5 ccm Wasserstoffsperoxyd, wobei die Dämpfe durch die siedende Natronlauge (30%) in Kolben *B* geleitet werden; von hier gelangen sie durch den Kühler in die Vorlage *C*, die mit 5 ccm Quecksilberreagenslösung beschickt ist und in der das Aceton nunmehr wieder eine blaue Opalescenz hervorruft. Diese blaue Opalescenz wird darauf mit solchen von Vergleichslösungen mit verschiedenen Acetongehalten verglichen.

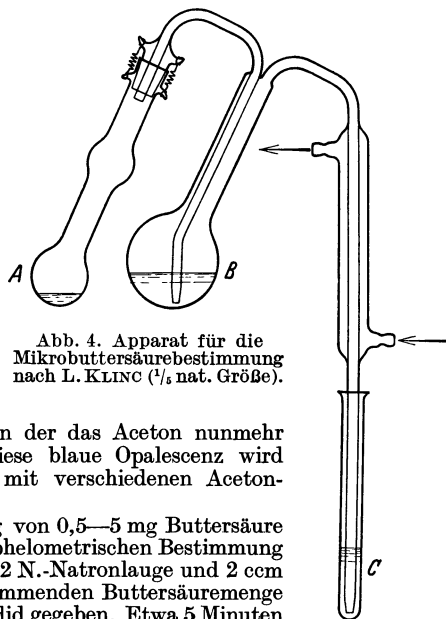


Abb. 4. Apparat für die Mikrobuttersäurebestimmung nach L. KLINC ( $\frac{1}{2}$  nat. Größe).

Bei der jodometrischen Bestimmung von 0,5—5 mg Buttersäure wird zunächst in gleicher Weise wie bei der nephelometrischen Bestimmung verfahren, aber in die Vorlage *C* werden 5 ccm 2 N.-Natronlauge und 2 ccm Jodlösung, und zwar je nach der in Frage kommenden Buttersäuremenge 0,02, 0,01 oder 0,005 N.-Jodlösung in Kaliumjodid gegeben. Etwa 5 Minuten nach beendeter Redestillation säuert man mit 7 ccm 2 N.-Schwefelsäure an und titriert den Jodüberschuß mit entsprechender Thiosulfatlösung zurück. 1 ccm 0,005 N.-Thiosulfatlösung entspricht hierbei 0,265 mg Buttersäure.

Wegen der bei diesen Mikrobestimmungen zu beobachtenden Einzelheiten muß auf die Originalmitteilung verwiesen werden.

$\beta$ ) Bestimmung nach J. GROSSFELD und F. BATTAY<sup>1</sup>. Das Verfahren dient zur Bestimmung der Buttersäure neben Ameisen-, Essig- und Capronsäure. — Zur Trennung von der Capronsäure schüttelt man die wäßrige Flüssigkeit mit unter 70° siedendem Petroläther aus. Werden auf 100 ccm wäßriger Flüssigkeit 20 ccm Petroläther verwendet, so verteilt sich die Buttersäure so, daß auf die wäßrige Phase bei der Ausschüttelung im Mittel 96,5% der vorhandenen Buttersäure entfallen. — Um weiter die Buttersäure von der Ameisensäure zu trennen, versetzt man 10 ccm des Ameisensäure-Buttersäure- und Essigsäuregemisches mit 20 ccm Kaliumpermanganatlösung (1%) und 1 ccm N.-Natronlauge und läßt 1 Stunde stehen. Die Ameisensäure ist dann restlos zu Kohlendioxyd und Wasser oxydiert. Um das überschüssige Kaliumpermanganat zu reduzieren und die Lösung anzusäuern, setzt man 20 ccm schwefelsaure Ferrosulfatlösung hinzu (200 g kristallisiertes Ferrosulfat + 50 ccm konz. Schwefelsäure auf 1 Liter),

<sup>1</sup> J. GROSSFELD u. F. BATTAY: Z. 1931, 61, 129.

so daß eine Lösung von insgesamt 51 ccm weiter zu behandeln ist. Von den 51 ccm werden in einfacher Destillation 40 ccm abdestilliert. Das Destillatgemisch von Buttersäure und Essigsäure wird nun mit reinster 0,1 N.-Kalilauge genau neutralisiert ( $t$ ), eingedampft, getrocknet und gewogen ( $a$ ). Zur Berechnung der Buttersäure aus dem mittleren Molekulargewicht kann man in ähnlicher Weise verfahren, wie es J. GROSSFELD<sup>1</sup> zur Bestimmung anderer Fettsäuren vorgeschlagen hat. Die vorhandene Menge Buttersäure kann aus dem Wert  $k$ , dem Verhältnis des Kaliumperchloratwertes ( $b$ ) und des Abdampfrückstandes ( $a$ ) in Prozenten ermittelt werden:

$$k = 100 \cdot \frac{b}{a}.$$

Der Kaliumperchloratwert  $b$  wird am einfachsten in der Weise ermittelt, daß man den Titrationswert  $t$  des Essigsäure-Buttersäuregemisches mit 13,856 =  $\frac{1}{10}$  des Molekulargewichtes des Kaliumperchlorats multipliziert; man erhält so die entsprechende Kaliumperchloratmenge in Milligramm. Die Menge der Kaliumsalze der Buttersäure + Essigsäure ist durch den getrockneten und gewogenen Abdampfrückstand  $a$  des titrierten Gemisches gegeben. Mit größerer Sicherheit geht man aber so vor, daß man die gewogenen Kaliumsalze  $a$  in Alkohol (95%) löst, aus der Lösung das Kalium mit Überchlorsäure (60%) fällt und das Kaliumperchlorat abfiltriert und wägt. Zur gewogenen Fällung sind für je 1 ccm Lösungsmittel 0,04 mg Kaliumperchlorat zu addieren. Ist  $k = 141,23$ , so ist keine Buttersäure vorhanden, und wenn  $k = 109,83$  ist, so befindet sich nur Buttersäure in dem Abdampfrückstand. Die Differenz beider Zahlen = 31,40 ergibt die größtmögliche Schwankung des  $k$ -Wertes bei einem Buttersäure-Essigsäuregemisch. In Gemischen beider Säuren wird der Buttersäuregehalt  $B$  in Prozenten durch folgende Formel errechnet:

$$B = 2,223 (141,23 - k).$$

Um das jedesmalige Berechnen des  $B$ -Wertes zu vermeiden, wurde eine Tabelle angefertigt, in welcher die Werte für  $B$  zwischen  $k = 109,83$  und 141,23 berechnet wurden, so daß man aus dem  $k$ -Wert  $B$  finden kann.

Um die Gesamtmenge der in Lösung vorhandenen Buttersäure zu erhalten, muß man, wenn von 51 ccm Lösung 40 ccm abdestilliert wurden, die in dem Destillat bestimmte Buttersäure mit dem Faktor  $\frac{100}{97,8} = 1,022$  multiplizieren; denn wenn das Destillat 80% des ursprünglichen Volumens beträgt, sind 97,8% der Buttersäure übergegangen. Hat man in der oben angegebenen Weise die Capronsäure mit Petroläther ausgeschüttelt, so muß der gefundene Buttersäurewert mit dem Faktor  $F = \frac{100}{96,5} = 1,037$  für die beim Ausschütteln verloren gegangene Buttersäure multipliziert werden, um die gesamte vorhandene Buttersäure zu erhalten.

J. K. PHELPS und H. E. PALMER<sup>2</sup> bestimmen die Buttersäure mittels Chininsulfats. Dieses Verfahren erscheint nach J. GROSSFELD und F. BATTAY<sup>3</sup> für kleine Mengen Buttersäure neben viel Essigsäure als wenig geeignet, zumal es auch umständlich und durch die Verwendung von Chinin sehr teuer ist.

$\gamma$ ) **Colorimetrische Bestimmungen.**  $\alpha\alpha$ ) Nach G. DENIGÈS. Das S. 1087 beschriebene Nachweisverfahren ist auch zur Bestimmung empfohlen, bei der man die auftretenden Farbentöne mit der von Lösungen mit bekanntem Buttersäuregehalt oder nach diesen geeichten Fuchsinlösungen vergleicht.

<sup>1</sup> J. GROSSFELD: Z. 1929, 58, 209.

<sup>2</sup> J. K. PHELPS u. H. E. PALMER: Journ. Biol. Chem. 1917, 29, 199; C. 1917, II, 776.

<sup>3</sup> J. GROSSFELD u. F. BATTAY: Z. 1931, 61, 129.

$\beta\beta$ ) Nach R. J. ALLGEIER, W. H. PETERSON und E. B. FRED<sup>1</sup>. Die Bestimmung beruht auf dem Nachweisverfahren von H. AGULHON (S. 1086). Die zu untersuchende Lösung wird mit Kupferreagens (85,26 g Kupferchlorid  $[\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}]$  in 1000 ccm N.-Salzsäure gelöst) behandelt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Zum colorimetrischen Vergleich dienen Essigsäure enthaltende Buttersäurelösungen von bekanntem Gehalt an letzterer.

#### 4. Oxalsäure.



Oxalsäure kristallisiert mit 2 Mol Wasser und schmilzt unter Entweichen des Wassers bei 101,5° und wasserfrei bei 189,5°; die wasserfreie Säure sublimiert bei 157—165°. In Wasser und Alkohol ist sie leicht löslich, in Äther schwer löslich. 100 Tle. Wasser lösen bei 10° 6,1, bei 30° 14,2 und bei 90° 120,2 Tle. wasserfreie Säure. Bei raschem Erhitzen zerfällt sie in Kohlensäure und Ameisensäure bzw. in Kohlensäure, Kohlenoxyd und Wasser, in letztere auch beim Erhitzen mit konz. Schwefelsäure. Mit Kaliumpermanganat wird sie in saurer Lösung zu Kohlensäure und Wasser oxydiert. — Das Calciumoxalat ist in Wasser und verd. Essigsäure sehr schwer löslich; 100 g Wasser (25°) lösen 0,68 mg davon. Silber-, Blei- und Mercurioxalat sind unlöslich in Essigsäure.

##### a) Nachweis.

$\alpha$ ) Nachweis mit Manganioxyd nach G. LOCHMANN<sup>2</sup>. Der Nachweis beruht auf der Rotfärbung des Trioxalatomanganiations,  $[\text{Mn}(\text{C}_2\text{H}_4)_3]'''$ .

Die zu untersuchende Lösung wird in einem kurzen Reagensglase, je nach ihrem Säuregehalt und ihrem Pufferungsvermögen mit Natriumacetatlösung, Ammoniak, Essigsäure, verd. Schwefelsäure oder in Sonderfällen mit Alkaliphosphatlösung so lange versetzt, bis ein kleiner, am Glasstabe herausgenommener Tropfen ein Stückchen Methylorangepapier — dünnes Filtrierpapier, mit 0,1% iger wäßriger MethylorangeLösung getränkt und getrocknet — braun färbt. Ob das Papier stark oder schwach braun wird, ist gleichgültig; nur darf es nicht gerötet werden oder gelb bleiben. Zu 1—2 ccm der richtig gepufferten Flüssigkeit gibt man bei Zimmertemperatur eine geringe Menge Manganioxyd ( $\text{Mn}_2\text{O}_3$ )<sup>3</sup> und schüttelt kurze Zeit. Bei Gegenwart von viel Oxalat tritt die kennzeichnende Rotfärbung sofort auf, in sehr verd. Lösungen nach  $\frac{1}{2}$  Minute. Wegen der Lichtempfindlichkeit des roten Trioxalatomanganiations stellt man die Reaktion nicht im Sonnenlicht an; im zerstreuten Tageslicht ist die Rotfärbung 1 Stunde lang haltbar.

<sup>1</sup> R. J. ALLGEIER, W. H. PETERSON u. E. B. FRED: Journ. Bacteriology 1929, 17, 79; C. 1930, I, 3703.

<sup>2</sup> G. LOCHMANN: Chem.-Ztg. 1933, 57, 214. — Vgl. auch J. F. SACHER: Chem.-Ztg. 1915, 39, 319 u. 458.

<sup>3</sup> Darstellung des Manganioxyds nach J. MEYER u. R. NERLICH (Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1921, 116, 125; Chem.-Ztg. 1933, 57, 215): Die Lösung von 6 g kryst. Manganchlorür und 6 g Ammoniumchlorid in 120 ccm Wasser wird mit 12 ccm 25% igem Ammoniak versetzt und in das Gemisch 24 Stunden lang unter Umrühren Luft eingeleitet. Der Niederschlag wird einige Male mit kaltem Wasser gewaschen, dann abgeklatscht und in eine  $\frac{1}{2}$  Stunden zuvor zusammengeriebene Aufschlammung aus 9,8 g kryst. Oxalsäure, 5,15 g Kaliumacetat und 34 ccm Wasser bei Zimmertemperatur (nicht über 23°) eingerührt. Man läßt das Gemisch bei möglichst schwacher Beleuchtung unter zeitweiligem Durchrühren 15 Minuten lang reagieren, saugt dann die Flüssigkeit ab, fügt zu ihr die Lösung von 6,9 g Kaliumacetat in 4 ccm Wasser und 3 ccm 2,5% iger Essigsäure und stellt sie zur Krystallisation  $\frac{1}{2}$  Stunde lang in Eiswasser. Die ausgeschiedenen, fast schwarzen Krystalle des Manganioxyds werden auf einem Sinterglasfilter gesammelt, auf ihm zweimal mit 50% igem Methylalkohol aufgerührt und schließlich im Dunkeln an der Luft auf einem Tonteller getrocknet; sie sind dann auch am Tageslicht haltbar.

Wenn mit der Reaktion auf Calciumoxalat (rein oder neben Calciumfluorid) geprüft werden soll, übergießt man den Niederschlag im Zentrifugengläse mit höchstens dem Zweifachen seines Volumens an 10%iger Schwefelsäure. Stellt man das Glas dann kurze Zeit in ein Wasserbad, so bilden sich unter Aufquellen des Niederschlages verhältnismäßig große Gipskrystalle und Oxalsäure wird frei. Der Brei wird abgekühlt, mit Wasser auf das doppelte Volumen gebracht und mit Natriumacetatlösung — man gebraucht meist 2—3 Tropfen einer Lösung von 1 Tl. kryst. Natriumacetat in 3 Tln. Wasser — bis zur Braunfärbung von Methylorangepapier versetzt. Man zentrifugiert hierauf und streut in die abgegossene Flüssigkeit das Manganioxyd ein.

Erfassungsgrenze: 0,2 mg  $C_2O_4$ “ in 0,5 ccm der gepufferten Lösung; Grenzkonzentration 1:2500.

Die Empfindlichkeit des Oxalsäurenachweises wird durch Manganosalze herabgesetzt. Auch Stoffe wie Wolframsäure oder Aluminiumion, die mit Oxalsäure Komplexverbindungen bilden, stören. Weinsäure und Milchsäure geben mit Manganioxyd dunkelbraune Lösungen und behindern den Nachweis von stark verd. Oxalsäure. Um die Störung zu beheben, kann man entweder die Oxalsäure als Calciumsalz ausfällen oder Weinsäure und Milchsäure dadurch unschädlich machen, daß man die zu untersuchende Lösung vor der  $p_H$ -Einstellung mit Borsäure aufkocht, wieder kühlt und von der Borsäure abfiltriert. — Ameisensäure stört die Reaktion nicht.

β) **Reaktion mit Resorcin nach L. H. CHERNOFF<sup>1</sup>.** Oxalsäure gibt mit Resorcin eine Blaufärbung. Zu 5 ccm der zu untersuchenden Lösung werden wenige Krystalle Resorcin gebracht und durch Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen wird mit 5 ccm konz. Schwefelsäure unterschichtet. Bei Anwesenheit von Oxalsäure bildet sich ein blauer Ring. Erwärmen ist zu vermeiden. Tritt kein blauer Ring auf, werden nochmals 5 ccm konz. Schwefelsäure zugefügt. Beim einige Minuten langen Kochen tritt Bildung einer tief dunkelgrünen Lösung ein, die beim Abkühlen in Eiswasser verschwindet, um beim Erwärmen wieder aufzutreten. Unterschichtet man die gelbgrüne Lösung mit der gleichen Menge konz. Schwefelsäure, so tritt wieder Blaufärbung ein.

Alle Färbungen werden nur mit Oxalsäure erhalten; Ameisen-, Essig-, Milch-, Citronen-, Malein-, Bernstein- und Benzoesäure beeinflussen die Reaktion nicht. Weinsäure beeinflusst die Reaktion in der Kälte selbst bei Mengen von 10 mg Oxalsäure und 100 mg Weinsäure in 2 ccm Wasser nicht.

H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL<sup>2</sup> haben dieses Verfahren auch zum mikrochemischen Nachweis empfohlen.

Nach K. BRAUER<sup>3</sup> wird etwa 0,1 g der zu untersuchenden Substanz mit 0,1 g Resorcin und 2 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und nur ganz wenige Sekunden im Reagensglase über freier Flamme erhitzt. Bei Gegenwart von Oxalsäure entsteht eine lila Färbung. Man kann die Reaktion auch in der Weise ausführen, daß man 0,3 g Substanz mit etwa 0,1 g Resorcin vermischt und auf dieses Gemisch nur 2 Tropfen konz. Schwefelsäure fallen läßt, so daß die Mischung nicht darin aufgelöst, sondern nur eben von der konz. Schwefelsäure durchfeuchtet wird. Erhitzt man wieder kurz über freier Flamme, so entsteht eine tiefblaue Färbung.

Milchsäure gibt mit verd. Schwefelsäure (1:1) und Resorcin beim Erhitzen eine Rotfärbung, während Weinsäure keine oder nur eine ganz schwach gelbliche Färbung gibt, die sich von der Rotfärbung bei Gegenwart von Milchsäure stark unterscheidet.

Nach H. KREIS<sup>4</sup> hängt das Gelingen der von BRAUER angegebenen Reaktion auf Oxalsäure und Milchsäure wesentlich von der Art des Erhitzens ab, so daß das Eintreten der Färbungen leicht übersehen werden kann. Beim Erwärmen mit wenig konz. Schwefelsäure und Resorcin auf dem Wasserbade tritt mit Oxalsäure eine stark indigoblaue Färbung ein, die nach Zusatz von viel Schwefelsäure und längerem Erhitzen in Violett übergeht. — Nach GERBER<sup>4</sup> sind alle diese Farbreaktionen mit größter Vorsicht zu bewerten.

γ) **Nachweis als Glykolsäure nach E. EEGRIWE<sup>5</sup>.** Der Nachweis beruht auf der Überführung der Oxalsäure in Glykolsäure und auf dem Nachweis der letzteren

<sup>1</sup> L. H. CHERNOFF: Journ. Amer. Chem. Soc. 1920, **42**, 1784; C. 1921, II, 57.

<sup>2</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **138**, 156.

<sup>3</sup> K. BRAUER: Chem.-Ztg. 1920, **44**, 494 u. 615.

<sup>4</sup> H. KREIS: Chem.-Ztg. 1920, **49**, 615.

<sup>5</sup> E. EEGRIWE: Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 125.

mit 2,7-Dioxynaphthalin. Zum Nachweis bringt man einen Tropfen der zu prüfenden Lösung in ein trockenes Reagensglas und gibt zur Reduktion etwas Magnesiumpulver hinzu, welches bald aufgelöst ist. Man versetzt mit 2—10 ccm einer Lösung von 0,01 g 2,7-Dioxynaphthalin in 100 ccm konz. Schwefelsäure und bringt das Reagensglas 15—25 Minuten in siedendes Wasser.

1 Tropfen Lösung, enthaltend 1 mg Oxalsäure, gibt mit 10 ccm Reagens dunkelviolette bis dunkelrötlich-violette Färbung; eine solche mit 0,1 mg Oxalsäure gibt mit 2 ccm Reagens eine violette Färbung und eine solche mit 0,01 mg Oxalsäure gibt mit 2 ccm Reagens eine violettrosa Färbung.

Dieser unter den gegebenen Bedingungen für Oxalsäure spezifische Nachweis übertrifft an Empfindlichkeit die Resorcinreaktion.

d) **Mikrochemischer Nachweis**<sup>1</sup>. Der mikrochemische Nachweis der Oxalsäure kann neben der Quecksilberchloridprobe (S. 1091) auch noch durch das Strontium- und Calciumsalz erbracht werden. Das Sublimat besteht in der Regel zuerst aus längeren Prismen, welche bald in kleinere Kryställchen zerfallen.

Strontiumoxalat wird am besten mittels Strontiumnitrats aus Lösungen gefällt, die ein wenig freie Salpetersäure enthalten. Das Strontiumoxalat besteht aus kleinen pyramidalen Kryställchen von quadratischem Querschnitt und aus prismatischen Krystallen (20—40  $\mu$ ). Zwischen gekreuzten Nicols bleiben die Krystalle in jeder Stellung dunkel, wenn die Spitze der Pyramide nach oben gekehrt ist; sie polarisieren lebhaft, mit Auslöschung nach den Kanten, wenn sie das Prisma zeigen. In kaltem Wasser ist das Strontiumoxalat nahezu unlöslich, etwas löslich in der Wärme, namentlich bei Zusatz von Salpetersäure und Ammoniumnitrat.

Handelt es sich um den Nachweis von Oxalsäure in außerordentlich stark verdünnten Lösungen, so kann man ihn durch das Calciumoxalat, das dem Strontiumoxalat in allen Stücken ähnelt, erbringen. Um Krystalle von 12—20  $\mu$  zu erhalten, muß man die Fällung durch einen starken Zusatz von Salpetersäure verzögern.

## b) Bestimmung.

Zur Bestimmung der Oxalsäure sind die folgenden Verfahren vorgeschlagen worden, von denen die gasvolumetrische Methode nach KRAUSE bei Abwesenheit von Ameisensäure für Oxalsäure spezifisch ist. Zur schnellen Bestimmung, namentlich bei Serienanalysen haben sich das gravimetrische Verfahren und die maßanalytischen Verfahren bewährt.

a) **Gasvolumetrisches Verfahren.**  $\alpha\alpha$ ) Bestimmung als Kohlenoxyd nach H. KRAUSE<sup>2</sup>. Oxalsäure wird durch Essigsäureanhydrid rasch und völlig quantitativ nach der Gleichung:  $C_2H_2O_4 = CO + CO_2 + H_2O$  zerlegt. Die Reaktion ist schon etwas oberhalb Zimmertemperatur merkbar, bei 50° lebhaft und bei 100° stürmisch.

Im Gegensatz zu der Einwirkung von konz. Schwefelsäure werden bis 100° Milchsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Weinsäure und Citronensäure von Essigsäureanhydrid nicht angegriffen, Ameisensäure nur langsam. Die Reaktion ist in Abwesenheit von Ameisensäure für Oxalsäure spezifisch.

Die zu untersuchende Substanz muß in fester Form vorliegen, bzw. durch Eindampfen von größeren Mengen Wasser befreit werden.

1. Freie Oxalsäure. Man wägt die 0,1—0,3 g Oxalsäure entsprechende Substanzmenge in einem etwas weiten Reagensglas ab, das durch einen mit Zu- und Ableitungsrohr für Gas versehenen Gummistopfen verschlossen werden kann. Das Zuleitungsrohr reicht ziemlich tief in das Reagensglas, das Ableitungsrohr endet unmittelbar unter dem Stopfen, durch dessen dritte Bohrung das spitz ausgezogene Abflußrohr eines kleinen Tropftrichters geht. Durch das Reagensglas wird Kohlensäure geleitet, die einem KIPPSchen Apparat unter den bekannten Vorsichtsmaßregeln luftfrei entnommen und durch eine Flasche mit Schwefelsäure flüchtig getrocknet wird. Das Gasableitungsrohr steht mit einem mit 50%iger

<sup>1</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 332. 1922. — EMICH: Mikrochemie 1926, 217.

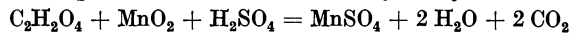
<sup>2</sup> H. KRAUSE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1919, 52, 426.

Kalilauge gefüllten SCHIFFSchen Azotometer in Verbindung. Dann läßt man in langsamen Kohlensäurestrom 5 ccm Essigsäureanhydrid einfließen, senkt das Reagensglas in 50—60° warmes Wasser und bringt dieses rasch zu gelindem Sieden. Nach beendeter Kohlenoxyd-entwicklung (5 Minuten) erhitzt man noch 5 Minuten und verdrängt dann durch einen lebhaften Kohlensäurestrom das Kohlenoxyd aus dem Reagensglas, ohne dieses aus dem Wasser zu entfernen. Das verwandte Essigsäureanhydrid muß im Kohlensäurestrom ausgekocht und unter Kohlensäure aufbewahrt sein. Um aus der pulverigen Substanz alle Luft zu entfernen, bringt man sie bei 105° eben zum Schmelzen oder dampft sie mit Wasser ein.

2. Wasserlösliche Oxalate. Da das bei der Reaktion gebildete essigsäure Salz das Oxalat vor der weiteren Einwirkung des Anhydrids schützt, löst man die Substanz in überschüssiger 15%iger Salzsäure und dampft in kochendem Wasserbade ein, bis eine feuchte Krystallmasse als Rückstand bleibt, mit der man unter häufigem Umschütteln nach 1 verfährt. Die vollständige Zersetzung erfordert beim Ammoniumsalz 30 Minuten, beim neutralen Kaliumsalz 1 Stunde.

3. Unlösliche Oxalate. Die Zersetzung gelingt mit einem Gemisch von 4,5 ccm Essigsäureanhydrid und 0,5 ccm konz. Schwefelsäure im kochenden Wasserbad beim Calciumsalz in 15—20 Minuten. Anfangs tritt fast völlige Auflösung ein, dann scheidet sich voluminöses Calciumsulfat aus, das durch häufiges Umschütteln bald feinkörnig wird. Der Oxalsäurewert des Essigsäureanhydrid-Schwefelsäuregemisches muß in einem blinden Versuch ermittelt werden. Die unter den angegebenen Verhältnissen von dem Gemisch abgegebene Gasmenge entspricht etwa 1 mg Oxalsäure und ist von der Dauer der Analyse unabhängig.

$\beta\beta$ ) Bestimmung als Kohlendioxyd<sup>1</sup>. Die Methode gründet sich darauf, daß die Oxalsäure durch Erwärmen mit carbonatfreiem Mangandioxyd und verd. Schwefelsäure quantitativ zu Kohlendioxyd oxydiert wird:



Man bringt das abgewogene Oxalat mit der 1½fachen Menge carbonatfreiem Mangandioxyd entweder in den BUNSENSchen Zersetzungsapparat oder in den FRESSENIUS-CLASSENSchen Apparat und verfährt im übrigen genau so wie bei sonstigen Kohlendioxydbestimmungen.

Hat man  $p$  g  $\text{CO}_2$  gefunden, so entsprechen diese  $p \cdot 1,0229$  g = Oxalsäure ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ).

$\beta$ ) Bestimmung als Calciumoxyd<sup>2</sup>. Man versetzt die neutrale Alkalioxalat-lösung mit einigen Tropfen Essigsäure, erhitzt zum Sieden und fällt mit kochender Calciumchloridlösung, läßt 12 Stunden stehen, wäscht mit heißem Wasser, verbrennt das Calciumoxalat naß im Platintiegel, wägt das Calciumoxyd und berechnet daraus die Oxalsäure ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ) durch Multiplikation mit 1,6055.

$\gamma$ ) Maßanalytische Bestimmungen.  $\alpha\alpha$ ) Titration mit Permanganatlösung nach I. M. KOLTHOFF<sup>3</sup>. Man löst 0,6299 g Oxalsäure oder 0,6699 g Natriumoxalat in 100 ccm Wasser, fügt 30 ccm 4 N.-Schwefelsäure hinzu, erwärmt auf 75—85° und titriert mit Kaliumpermanganatlösung. Am Anfang muß das Reagens langsam zugefügt werden, bis die Flüssigkeit wieder farblos ist, sodann kann man schneller unter fortwährendem Umschwenken bis zum Endpunkt titrieren.

$\beta\beta$ ) Jodometrische Bestimmung nach L. ROSENTHALER<sup>4</sup>. Oxalsäure reduziert in der Wärme Jodsäure, bei Gegenwart einer genügenden Jodsäuremenge tritt infolgedessen Jod auf. Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:  $5 (\text{COOH})_2 + 2 \text{HJO}_3 = 6 \text{H}_2\text{O} + 10 \text{CO}_2 + \text{J}_2$ . Man erwärmt die Oxalsäure oder das Oxalat nach Zusatz von verd. Schwefelsäure mit überschüssiger  $\frac{1}{60}$  N.-Kaliumjodatlösung unter öfterem Umschütteln auf dem Dampfbade, bis das frei gewordene Jod entfernt ist, läßt erkalten und titriert nach Zusatz von Kaliumjodid mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung. Der Unterschied zwischen den ccm der zugesetzten  $\frac{1}{60}$  N.-Kaliumjodatlösung und den ccm 0,1 N.-Thiosulfat-

<sup>1</sup> TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie Bd. 2, S. 363, 1923.

<sup>2</sup> TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, Bd. 2, S. 362, 1923.

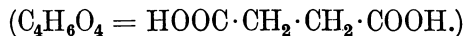
<sup>3</sup> I. M. KOLTHOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1924, 64, 185.

<sup>4</sup> L. ROSENTHALER: Zeitschr. analyt. Chem. 1922, 61, 219.

lösung, ergibt die zur Oxydation verbrauchte Jodmenge. 1 ccm  $\frac{1}{60}$  N.-Jodatlösung entspricht 3,7506 mg Oxalsäure und 5,5833 mg Natriumoxalat.

$\gamma\gamma$ ) Mercurinitratverfahren nach A. ABELMANN<sup>1</sup>. Zu der Oxalsäurelösung gibt man 30—40 Tropfen 5 N.-Salpetersäure, fällt unter Umschütteln mit einem Überschuß von 0,1 N.-Mercurinitratlösung, versetzt mit etwa 50 ccm gesättigter, chlorfreier Kaliumnitratlösung, füllt auf 100 ccm auf und titriert einen aliquoten Teil des Filtrates nach Zugabe von 1 ccm Ferriammoniumsulfatlösung und soviel Salpetersäure, daß möglichst Entfärbung eintritt, mit Ammoniumrhodanid.

## 5. Bernsteinsäure.



Bernsteinsäure (Äthylenbernsteinsäure) bildet Krystalle vom Schmp. 185<sup>0</sup> und dem Siedepunkt 235<sup>0</sup>; sie ist unter 2,2 mm Druck bei 156—157<sup>0</sup> unzer setzt sublimierbar. Die Säure ist löslich in 20 Tln. Wasser (15<sup>0</sup>), 10 Tln. Alkohol (96%), 6,3 Tln. Methylalkohol, 18 Tln. Aceton und 83 Tln. Äther. Gegen Oxydationsmittel und konz. Schwefelsäure ist sie verhältnismäßig beständig.

Über die Eigenschaften von Salzen der Bernsteinsäure (Äthylenbernsteinsäure) liegen unter anderem folgende Angaben vor:

Bernsteinsäure Salze geben in neutraler Lösung mit Eisenchlorid braune Niederschläge. — Calciumchlorid gibt mit freier Bernsteinsäure keine Fällung; bei Zusatz von Alkohol entsteht jedoch ein voluminöser Niederschlag von Calciumsuccinat. — Bariumchlorid scheidet aus der wäßrigen Lösung der bernsteinsäuren Salze in der Siedehitze Bariumsuccinat aus, das in Salzsäure löslich ist. — Bleiacetat und Silbernitrat geben mit Succinaten sofort Niederschläge, ersteres auch mit der freien Säure, doch findet anfangs wieder Auflösung statt. — Goldchlorid wird durch Bernsteinsäure oder die Lösung eines bernsteinsäuren Salzes in Salzsäure selbst in der Wärme nicht reduziert. — Bernsteinsäure wird in schwefelsaurer Lösung durch 5%ige Kaliumpermanganatlösung nicht oxydiert.

### a) Nachweis.

Für den Nachweis der Bernsteinsäure sind insbesondere folgende Verfahren<sup>2</sup> vorgeschlagen worden:

$\alpha$ ) Nachweis nach W. OECHSNER DE CONINCK<sup>3</sup>. Bringt man eine konz. wäßrige Lösung von Bernsteinsäure in eine wäßrige Suspension von Calciumsalicylat und erhitzt die Flüssigkeit gelinde, so tritt eine sehr beständige, blaß bis lebhaft rosa Färbung auf. Äpfelsäure ruft unter den gleichen Bedingungen ebenfalls eine zarte Rosafärbung hervor, die aber wenig beständig ist und bei 15—20 Minuten langem gelindem Sieden, nachdem sie einen schmutzig rosa Ton angenommen hat, allmählich verblaßt.

$\beta$ ) Nachweis nach L. ROSENTHALER<sup>4</sup>. Erwärmt man Bernsteinsäure mit Resorcin und konz. Schwefelsäure auf 190—195<sup>0</sup>, verdünnt nach dem Erkalten, kocht kurz auf und versetzt nach dem Erkalten mit Ammoniak, so entsteht eine rote, stark grün fluoreszierende Flüssigkeit.

$\gamma$ ) Mikrochemischer Nachweis<sup>5</sup>. Bleiacetat bringt in Lösungen von Bernsteinsäure und von leicht löslichen Succinaten einen weißen Niederschlag hervor,

<sup>1</sup> A. ABELMANN: Ber. Deutsch. Pharm. Ges. 1921, **31**, 130.

<sup>2</sup> Das Verfahren von C. NEUBERG (Zeitschr. physiol. Chem. 1901, **31**, 574), welches auf der Pyrrolbildung beruht, ist nicht für Bernsteinsäure eindeutig, da nach A. J. VIRTANEN und N. FONTELL (Ann. Acad. scient. fennicae A 1926, **26**; C. 1927, I, 153) auch Milchsäure, Brenztraubensäure, Acetaldehyd, Dioxyaceton in Mengen von etwa 2 mg die gleiche Reaktion geben.

<sup>3</sup> Bul. Soc. chim. France 1914, [4] **15**, 93; C. 1914, I, 917.

<sup>4</sup> L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen, S. 330. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

<sup>5</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 334, 1922. — EMICH: Mikrochemie 1926, 218.



der aus farblosen und scharf umrissenen Rauten von 90—120  $\mu$  besteht. Der spitze Winkel liegt zwischen 70—75°. In Wasser sind die Krystalle auch bei Siedehitze fast unlöslich. Von Salpetersäure werden sie leicht gelöst, etwas schwieriger von Essigsäure und von Ammoniumacetat. Die Reaktion ist sehr empfindlich und durch die Klarheit und scharfe Ausbildung, welche auch den kleinsten Krystallen von Bleisuccinat eigen ist, zugleich charakteristisch.

### b) Bestimmung.

$\alpha$ ) **Bestimmung nach C. SCHMITT und C. HIEPE**<sup>1</sup>. Bernsteinsäure wird aus Alkalisuccinatlösungen durch Bariumchlorid in der Siedehitze sofort und vollständig gefällt. Man löst den mit heißem Wasser gewaschenen Niederschlag in Salzsäure und bestimmt das Barium oder Sulfat.

Nach C. v. D. HEIDE und H. STEINER<sup>2</sup> lösen 100 ccm Wasser bei 15° 0,406 und bei 100° 0,210 g Bariumsuccinat, entsprechend 0,19 bzw. 0,10 g Bernsteinsäure, dagegen 100 ccm 80%iger Alkohol nur 0,2 mg Bariumsuccinat. Man muß daher die Fällung in 80%igem Alkohol vornehmen.

$\beta$ ) **Bestimmung nach A. RAU**<sup>3</sup>. Er fällt die Bernsteinsäure aus neutraler Lösung mit Silbernitratlösung (5%) und wägt das Silbersuccinat als solches oder bestimmt es als Silber. Man kann auch das Silbersuccinat mit 0,1 N.-Natriumchloridlösung zerlegen und das überschüssige Natriumchlorid titrimetrisch bestimmen.

R. KUNZ<sup>4</sup> versetzt die wäßrige, mit 0,1 N.-Lauge genau neutralisierte Lösung der Bernsteinsäure mit 0,1 N.-Silbernitratlösung im Überschuß, füllt auf 100 ccm auf und filtriert. In 50 ccm des Filtrates wird schließlich mit 0,1 N.-Ammoniumrhodanidlösung der Silberüberschuß nach VOLHARD zurücktitriert. 1 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung = 0,0059 g Bernsteinsäure.

$\gamma$ ) **Bestimmung nach E. CH. GREY**<sup>5</sup>. Die Bestimmung beruht auf der Unlöslichkeit des Calciumsuccinats in 85%igem Alkohol. Die Methode besitzt erhebliche Fehlerquellen, weshalb von manchen Autoren die Abscheidung als Bariumsalz vorgezogen wird. Nachdem die flüchtigen Säuren durch Wasserdampfdestillation entfernt sind, werden die Säuren mit Äther aufgenommen. Die so isolierten Säuren werden in heißem Wasser, ohne zu kochen, mit Calciumcarbonat neutralisiert, mit etwas Phenolphthalein und bis zur Rötung mit Kalkwasser versetzt. In einem aliquoten Teil der Lösung wird langsam so weit verdunstet, daß nach dem Auffüllen mit 96%igem Alkohol ein 85%iger Alkohol erhalten wird. Nachdem der Niederschlag krystallin geworden ist, wird filtriert und in einem aliquoten Teil des Filtrates nach dem Verjagen des Alkoholes der Kalk bestimmt. Die so gefundene Kalkmenge, von der vorher bestimmten, der Gesamtheit der Säuren entsprechenden Kalkmenge abgezogen, ergibt die der vorhandenen Bernsteinsäure entsprechenden Kalkmenge.

Pepton hindert die Fällung des Calciumsuccinates mit 85%igem Alkohol. Beim Eindampfen schwach alkalischer Lösungen der betreffenden Calciumsalze gehen Milch- und Bernsteinsäure verloren.

$\delta$ ) **Polarimetrische Bestimmung nach P. W. Clutterbuck**<sup>6</sup>. Die Methode beruht auf der Oxydation der Bernsteinsäure durch die Succinoxydase über Fumarsäure zu l-Äpfelsäure, die ihrerseits nach Zusatz von Uranylacetat polarimetrisch bestimmt wird (S. 1106).

<sup>1</sup> C. SCHMITT u. C. HIEPE: Zeitschr. analyt. Chem. 1882, **21**, 536.

<sup>2</sup> C. v. D. HEIDE: u. H. STEINER: Z. 1909, **17**, 291. — Vgl. auch G. JÖRGENSEN: Z. 1907, **13**, 241.

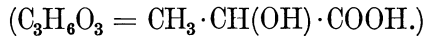
<sup>3</sup> A. RAU: Arch. Hygiene 1892, **14**, 225; Zeitschr. analyt. Chem. 1893, **32**, 482.

<sup>4</sup> R. KUNZ: Z. 1903, **6**, 720.

<sup>5</sup> E. CH. GREY: Bull. Soc. chim. de France 1917, **21**, 136; C. 1917, **II**, 647.

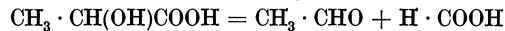
<sup>6</sup> P. W. CLUTTERBUCK: Biochem. Journ. 1927, **21**, 512; C. 1927, **II**, 1724.

## 6. Milchsäure.



Als Milchsäure ist hier lediglich die Gärungsmilchsäure (Äthylidenmilchsäure oder  $\alpha$ -Oxypropionsäure) behandelt; sie ist ein racemisches Gemisch von d- und l-Milchsäure und praktisch in erster Linie von Bedeutung<sup>1</sup>.

Die Milchsäure bildet hygroskopische, bei 18° schmelzende Krystalle und kommt im allgemeinen in sirupöser Form in den Handel; sie hat das Spez. Gewicht ( $\frac{15^\circ}{4^\circ}$ ) 1,2485 und siedet unter 12 mm Druck bei 119°. Sie ist mischbar mit Wasser und Alkohol, löslich in Äther, unlöslich in Petroläther, Chloroform und Schwefelkohlenstoff. Mit Wasserdämpfen ist sie etwas, mit überhitztem Wasserdampf leicht flüchtig. — Salpetersäure und alkalische Permanganatlösung oxydieren die Milchsäure zu Oxalsäure; durch Jodwasserstoffsäure wird sie zu Propionsäure reduziert. Beim Erhitzen mit Schwefelsäure zerfällt sie in Acetaldehyd und Ameisensäure (oder in Kohlenoxyd und Wasser) nach der Gleichung:



Durch ammoniakalischen Bleiessig kann bei Gegenwart von Alkohol die Milchsäure quantitativ gefällt werden. Calcium- und Bariumlactat sind in Wasser löslich. Beim Erwärmen von Milchsäure mit Jod und Natronlauge entsteht Jodoform.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an Milchsäure folgende Reinheitsanforderungen:

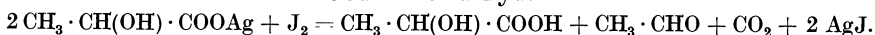
Milchsäure darf bei gelindem Erwärmen nicht nach Fettsäuren riechen. — Wird in einem mit Schwefelsäure gereinigten Glase Milchsäure mit Schwefelsäure, die beide zuvor auf etwa 5° abgekühlt werden, unterschichtet, so darf an der Berührungsstelle der beiden Säuren innerhalb einer Viertelstunde höchstens eine schwach gelbliche Zone entstehen (Zucker). — Die wäßrige Lösung (1 + 9) darf weder durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Schwermetallsalze), noch durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure), noch durch Ammoniumoxalatlösung (Calciumsalze), noch nach Zusatz von einigen Tropfen Salpetersäure durch Silbernitratlösung (Salzsäure) verändert werden. — Die weingeistige Lösung (1 + 9) darf durch 5 Tropfen Calciumacetatlösung nicht getrübt werden (Weinsäure). — Die mit Ammoniakflüssigkeit schwach übersättigte wäßrige Lösung (1 + 9) darf durch einige Tropfen verd. Calciumchloridlösung nicht getrübt werden (Oxalsäure). — Wird 1 ccm Milchsäure in einem Probierröhr in 2 ccm Äther eingetropft, so muß eine vorübergehend entstehende Trübung spätestens nach Zugabe des 10. Tropfens verschwinden; bei weiterem Zutropfen muß die Mischung klar bleiben (Mannit, Glycerin). — Wird 1 g Milchsäure in einem Porzellantiegel vorsichtig erhitzt, so muß sie bis auf einen geringen Ansatz von Kohle verbrennen (Weinsäure, Citronensäure, Zucker); beim Glühen darf höchstens 0,001 g Rückstand hinterbleiben.

Milchsäure des Handels bestand nach spektroskopischen Untersuchungen von R. DIETZEL und K. TÄUFEL<sup>2</sup> (S. 354) aus einem Gemisch von 2 Tln. Milchsäure und 1 Tl. Lactylmilchsäure.

### a) Nachweis.

$\alpha$ ) **Nachweis durch Acetaldehydbildung.** Der Nachweis der Milchsäure beruht hauptsächlich auf dem Zerfall in Acetaldehyd<sup>3</sup> und Ameisensäure und dem Nachweis des ersteren mittels Farbreaktionen; diese sind aber zum Teil für Acetaldehyd nicht eindeutig.

$\alpha\alpha$ ) Nach R. O. HERZOG<sup>4</sup> entwickeln bereits kleine Mengen Milchsäure bei Zusatz von Silbersalzen und Jod Acetaldehyd.



<sup>1</sup> Die d-Milchsäure (Fleisch-, Paramilchsäure) kommt im Fleischsaft vor und entsteht ferner als Nebenprodukt bei der Buttersäuregärung.

<sup>2</sup> R. DIETZEL u. K. TÄUFEL: Z. 1925, 49, 65.

<sup>3</sup> Äpfelsäure gibt bei der Oxydation ebenfalls Acetaldehyd.

<sup>4</sup> R. O. HERZOG: Liebigs Ann. 1907, 351, 263; Z. 1908, 16, 293.

Die Reaktion läßt man am besten bei Gegenwart einer Spur Alkohol in einem Kölbchen oder Reagensglase vor sich gehen und leitet durch ein Knierohr die Reaktionsprodukte in wenig Wasser. Der Acetaldehyd wird durch etwas Nitroprussidnatrium und Piperidin nachgewiesen (S. 1046). Es entsteht eine blaue Färbung, die auf Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge violett, rot, gelb wird.

$\beta\beta$ ) Nach W. WINDISCH<sup>1</sup> lassen sich geringe Mengen Milchsäure durch Destillation mit Schwefelsäure und Kaliumdichromat an der Färbung von vorgelegtem NESSLER-Reagens erkennen. Empfindlichkeit der Reaktion = 0,005%.

$\gamma\gamma$ ) Nach G. DENIGÈS<sup>2</sup> erhitzt man mit konz. Schwefelsäure und weist den Acetaldehyd durch Farbreaktionen nach. 0,2 ccm der nicht stärker als 2%igen Milchsäurelösung werden mit 2 ccm Schwefelsäure ( $d = 1,84$ ) 2 Minuten im Wasserbade erhitzt, nach dem Abkühlen 1—2 Tropfen einer alkoholischen 5%igen Guajacol- oder Kodeinlösung zugegeben und umgeschüttelt. Beim Zusatz von Guajacol entsteht eine fuchsinrote Färbung; 0,1 mg sind durch Rosafärbung noch nachweisbar. Kodein gibt bei stärkeren Konzentrationen gelbrote, bei schwächeren gelbe Färbung. Die Reaktion nach DENIGÈS versagt bei einer Konzentration der Milchsäure über 0,2%.

Zum Nachweis des Acetaldehyds können nach G. CAPELLI<sup>3</sup> noch folgende Phenole dienen: Phenol, p-Kresol, Thymol, Brenzcatechin, Resorcin<sup>4</sup>, Hydrochinon, Orcin, Pyrogallol und Phloroglucin. Die Färbungen gehen nach 2 Minuten langem Erhitzen auf dem Wasserbade in Rotbraun über, ausgenommen Brenzcatechin, Orcin und Phloroglucin, die nach 2 Minuten fuchsinrote oder orangerote Färbungen zeigen. Das empfindlichste Reagens ist p-Kresol mit 1:100000 und 1:200000 für Acetaldehyd.

L. EKKERT<sup>5</sup> löst einige Zentigramm Brenzcatechin in 5—6 ccm konz. Schwefelsäure und schichtet auf die Lösung 1—2 ccm verd. Milchsäure; es entsteht an der Grenzfläche sofort eine blutrote Färbung, deren Stärke allmählich zunimmt. Man kann auch 0,5 ccm verd. Milchsäure der konz. Schwefelsäure zumischen und auf die warme Flüssigkeit eine 1%ige Brenzcatechinlösung schichten; 0,02% Milchsäure sind noch nachweisbar. Resorcin, Hydrochinon und  $\alpha$ -Naphthol geben nur grünlichgelbe bis braune Färbungen.

W. M. FLETCHER und F. G. HOPKINS<sup>6</sup> verwenden zum Nachweise des Acetaldehyds konz. Schwefelsäure und Thiophenlösung.

$\beta$ ) Nachweis als Eisen(3)-natriumlactat. Zum Nachweise der Milchsäure als komplexes Eisen(3)-natriumlactat  $[\text{Fe}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3)_2] \text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  dampft man nach K. A. HOFMANN<sup>7</sup> die auf Milchsäure zu prüfende Lösung mit durch Natriumcarbonat alkalisch gemachte und mit Essigsäure angesäuerte Eisenchloridlösung in nicht zu großem Überschuß auf dem Wasserbade stark ein. Man erhält nach einigen Stunden den grünen Niederschlag bzw. ebensolche Flitter des Eisen(3)-natriumlactates, die bei 80° wasserfrei werden.

Reines Wasser löst die Flitter bei 20° nicht, beim Schütteln entsteht ein blaßgelbes Suspensoid von neutraler Reaktion. 3%iges Ammoniak bewirkt erst nach Stunden Bräunung und in der Hitze Fällung von Eisenhydroxyd. Verd. Natronlauge liefert langsam ein rotes Pulver, Natriumbicarbonatlösung greift bei 20° nicht an, 15%ige Essigsäure und 1%ige Salzsäure lösen sehr langsam. Beim Schütteln mit Tanninlösung tritt erst nach Stunden blauviolette Färbung auf.

$\gamma$ ) Nachweis als Zinksalz. Man versetzt die auf Milchsäure zu prüfende Lösung mit Zinkcarbonat und kocht am Rückflußkühler. Alsdann wird das Zinklactat nach S. 1102 durch Krystallisation gewonnen, das nunmehr quantitativ zu analysieren ist.

<sup>1</sup> W. WINDISCH: Wochschr. Brauerei 13, 214; C. 1887, 826.

<sup>2</sup> G. DENIGÈS: Bull. Soc. chim. France 1909, [4] 5, 647 u. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 1909, 49, 193; Z. 1910, 20, 722.

<sup>3</sup> G. CAPELLI: Ann. Chim. analyt. appl. 1926, 16, 53—68; C. 1926, I, 3260.

<sup>4</sup> Vgl. K. BRAUER: Chem.-Ztg. 1920, 44, 494. — H. KREIS: Chem.-Ztg. 1920, 44, 615; ferner H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 156.

<sup>5</sup> L. EKKERT: Pharm. Zentralh. 1925, 66, 552, 753, 800.

<sup>6</sup> W. M. FLETCHER u. F. G. HOPKINS: Journ. Physiol. 1907, 35, 247; C. 1907, I, 1442.

<sup>7</sup> K. A. HOFMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1920, 53, 2224.

Die Darstellung des Zinksalzes kann auch zur Entscheidung benutzt werden, welche von den drei Milchsäuren vorliegt. Das inaktive Zinklactat enthält 3 Mol. Wasser, während das der d- und l-Milchsäure nur 2 Mol. Wasser enthält. Auch ist das inaktive Salz weniger löslich in Wasser.

d) **Nachweis mit Kaliumrhodanid nach F. G. GERMUTH<sup>1</sup>.** 15 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit — bei Vorliegen von Lactaten muß mit einem geringen Überschuß an Salzsäure angesäuert werden — werden in einem Konzentrationsbereich von 0,5—5% Milchsäure mit einer 15%igen Lösung von Kaliumrhodanid versetzt, wobei für jedes Prozent Milchsäure 0,5 ccm Reagens zuzusetzen sind. Es entsteht in allen Fällen je nach der Konzentration der Lösung eine orange bis purpurrote, auch in der Wärme beständige Färbung.

Diese Färbung rührt nicht von Ferrirhodanid her, da sie auf Zusatz einer gesättigten Lösung von Quecksilberchlorid nicht verschwindet. Diese Nachweismethode kann auch zur colorimetrischen Bestimmung verwandt werden.

e) **Sonstige Reaktionen.** Außer den vorstehenden Reaktionen sind unter anderen noch folgende in der Literatur angegeben:

1. **Reaktion von UFFELMANN<sup>2</sup>.** Löst man 1 Tropfen Eisenchloridlösung und 0,4 g Phenol in 50 ccm Wasser, so wird das blau gefärbte Reagens durch Milchsäure gelb gefärbt. Empfindlichkeit der Reaktion 1:10000. Die Reagenslösung läßt sich nach E. v. KAZAY<sup>3</sup> durch Zusatz von Chloriden und Sulfaten, am zweckmäßigsten Quecksilbersulfat, stabilisieren und in ihrer Farbe verstärken, derart, daß sie sich auch in größerer Verdünnung nicht entfärbt. Die Reaktion nach UFFELMANN ist für Milchsäure nicht spezifisch, sondern wird auch von Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure und Äpfelsäure gegeben<sup>4</sup>.

2. **CRONER-CRONHEIMS<sup>5</sup> Reagens auf Milchsäure** ist eine Lösung von 2 g Kaliumjodid und 1 g Jod in 50 ccm Wasser, der noch 5 g Anilin zugefügt werden. Die zu prüfende Flüssigkeit kocht man mit Kalilauge und gibt dann das Reagens hinzu. Milchsäure bewirkt das Auftreten von Isonitrilgeruch. Empfindlichkeit 1:4000.

3. **Reaktionen nach C. REICHARD<sup>6</sup>.** Er hat Reaktionen mit Ferro- und Ferricyanalkalium, ferner mit Kaliumbichromat, Ammoniumheptamolybdat und Natriumwolframat angegeben.

ζ) **Mikrochemischer Nachweis.** Zum mikrochemischen Nachweise eignet sich besonders das Mikrobecherverfahren von C. GRIEBEL<sup>7</sup> (S. 1026), bei dem die Milchsäure nach C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>8</sup> durch Kaliumpermanganatlösung oxydiert und der entstehende Acetaldehyd mit o-, p- oder m-Nitrophenylhydrazin kondensiert wird.

Die nötigenfalls von vorhandenen Alkoholen, Aldehyden und Ketonen befreite flüssige oder breiige Substanz wird in dem Mikrobecher — wenn nötig nach Zusatz von 2—3 Tropfen Wasser — mit einem Tropfen 0,5%iger Kaliumpermanganatlösung versetzt und ein Deckgläschen mit einem Tropfen p- oder m-Nitrophenylhydrazin aufgelegt; des weiteren wird nach S. 1026 auf Acetaldehyd geprüft.

Entstehen keine Hydrazonekrystalle, so ist das Verfahren nach erneutem Zusatz von je 1 ccm Permanganatlösung so oft zu wiederholen, bis entweder Krystallbildung eingetreten ist oder die Permanganatfarbe während des Erwärmens nicht mehr verschwindet.

Äpfelsäure liefert bei diesem Verfahren ebenfalls Acetaldehyd; Citronensäure in größeren Mengen liefert Aceton, das sich durch m-Nitrophenylhydrazin nachweisen läßt.

<sup>1</sup> F. G. GERMUTH: Ind. Engin. chem. 1927, 19, 852; C. 1927, II, 1740.

<sup>2</sup> UFFELMANN: Pharm. Zentralh. 1887, 28, 582; 1888, 29, 323. — Vgl. ferner BRUNNER: Pharm. Zentralh. 1887, 28, 581. — G. KELLING: Zeitschr. physiol. Chem. 18, 397. — H. KÜHL Pharm. Ztg. 1910, 55, 120.

<sup>3</sup> E. v. KAZAY: Pharm. Monatsh. 1922, 3, 97.

<sup>4</sup> H. KÜHL: Milchw. Zentralbl. 6, 61; C. 1910, I, 963. — A. KWISDA: Zeitschr. Österr. Apoth.-Ver. 44, 431; C. 1906, II, 1087.

<sup>5</sup> CRONER-CRONHEIM: Berl. klin. Wochenschr. 1905, 1080; MERCK'S Reagenzien-Verz., S. 112, 1929.

<sup>6</sup> C. REICHARD: Pharm. Zentralh. 1912, 53, 51.

<sup>7</sup> C. GRIEBEL: Z. 1924, 47, 438.

<sup>8</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Z. 1928, 56, 158.

Eine mikrochemische Reaktion zum Nachweise von Acetaldehyd mit Resorcin haben H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL<sup>1</sup> angegeben.

Ferner kommen nach G. KLEIN und H. WENZL<sup>2</sup> für den Nachweis der Milchsäure die Krystallbildungen der Zink-, Kupfer- und Thoriumlactate in Betracht. Von anderer Seite ist Kobaltolactat zum Nachweise empfohlen worden<sup>3</sup>.

## b) Bestimmung.

α) Bestimmung als Acetaldehyd. αα) Das titrimetrische Verfahren von O. v. FÜRTH und D. CHARNASS<sup>4</sup> beruht auf der Oxydation der Milchsäure

mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung zu Acetaldehyd und dessen Bestimmung nach dem Verfahren von M. RIPPER (S. 1032). In der Abänderung von S. TANAKA und M. ENDO<sup>5</sup> wird es, wie folgt, ausgeführt:

Die auf Milchsäure zu untersuchende Lösung (am besten etwa 5 mg Milchsäure enthaltend) wird in dem Oxydationskolben *A* (Abb. 5) mit 33 ccm 10%iger Schwefelsäure versetzt, mit Wasser auf etwa 150 ccm verdünnt und etwas Talkpulver als Siederleichterer hinzugefügt. Der Tropftrichter *B* wird mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung gefüllt. Die Vorlage *C* wird mit 5–10 ccm einer mit Kohlensäure gesättigten etwa 0,02 N.-Natriumbisulfidlösung<sup>6</sup> versetzt, der Vorstoß *D* hineingesteckt, mittels eines Gummischlauchs mit dem unteren Teil des Kühlers *E* verbunden und das Glasrohr *F* des Vorstoßes *D* in das Wasser im Becherglase *G* hineingetaucht.

Nunmehr wird der Inhalt im Oxydationskolben vorsichtig erhitzt, gleichzeitig Bicarbonatlösung hineingetropft, bis zum schwachen Sieden erhitzt und dadurch die Luft im Apparate durch die entwickelte Kohlensäure vollkommen verdrängt.

Nach Austreibung der Luft aus dem Apparat, und wenn das Destillat in den Vorstoß zu steigen beginnt, läßt man durch den Tropftrichter *B* tropfenweise — nicht in Strahlen — 0,005 molare Kaliumpermanganatlösung in den Oxydationskolben einfließen. Auf diese Weise wird die Milchsäure zu Aldehyd oxydiert.

Wenn der Inhalt des Kolbens *A* eine rötliche Färbung zu zeigen beginnt, unterbricht man den Zusatz der Permanganatlösung. Nun setzt man die Destillation noch etwa 30 Minuten weiter fort, gießt eine kleine Menge von

Natriumbicarbonatlösung aus *B* hinzu, um das im Vorstoß *D* aufgestiegene Destillat in die Vorlage überzutreiben. Man spült nun den Vorstoß *D* aus, verschließt die Vorlage *C* mit einem Gummistopfen, mischt gut durch, fügt

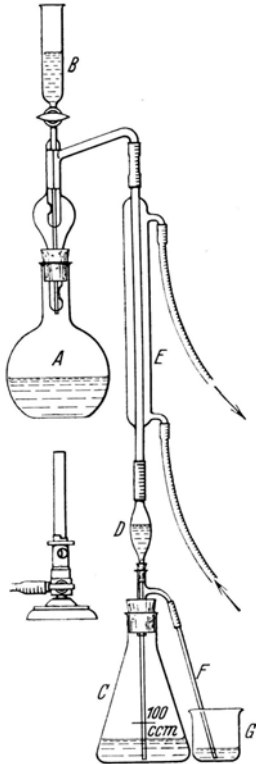


Abb. 5. Apparat zur Acetaldehydbestimmung nach S. TANAKA und M. ENDO.

<sup>1</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 156.

<sup>2</sup> G. KLEIN u. H. WENZL: Mikrochemie 1932, 11, 73.

<sup>3</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 337, 1922.

<sup>4</sup> O. v. FÜRTH u. D. CHARNASS: Biochem. Zeitschr. 1910, 26, 199. — Vgl. auch TH. E. FRIEDEMANN, M. COTONIO u. PH. A. SHAFFER: Journ. Biol. Chem. 1927, 73, 335; C. 1927, II, 2215. — TH. E. FRIEDEMANN u. A. I. KENDALL: Journ. Biol. Chem. 1929, 82, 23; C. 1930, I, 266.

<sup>5</sup> S. TANAKA u. M. ENDO: Biochem. Zeitschr. 1929, 210, 120.

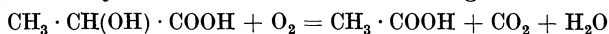
<sup>6</sup> Die Natriumbisulfidlösung (2,5 g Natriumbisulfid im Liter enthaltend) wird eingestellt, indem 10 ccm auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt und mit 0,01 N.-Jodlösung unter Zusatz von 1 ccm 0,5%iger Stärkelösung titriert werden.

nach etwa 30 Minuten 1 ccm Stärkelösung<sup>1</sup> hinzu, füllt mit Wasser bis zur Marke — 100 ccm — und titriert mit 0,01 N.-Jodlösung. Aus dem Verbrauch von Jod wird die Menge der Milchsäure berechnet. 1 ccm 0,01 N.-Jodlösung entspricht 0,9 mg Milchsäure.

ββ) Colorimetrische Bestimmung nach B. MENDEL und I. GOLDSCHIEDER<sup>2</sup>. Von der klaren Flüssigkeit werden mit einer Pipette 0,5 ccm vorsichtig abgehoben und in ein mit Schwefelsäure und Wasser gereinigtes, absolut trockenes Reagensglas gebracht. Unter Köhlen in Eiswasser und Schütteln werden 3 ccm der Schwefelsäure (Acid. sulfur. conc. pro. analys. acidi lactici Kahlbaum) tropfenweise zugesetzt. Dann wird die Flüssigkeit genau 4 Minuten in siedendem Wasser erhitzt und sofort in Eiswasser gekühlt. Nach 2 Minuten wird genau 0,1 ccm der 0,125%igen Veratrollösung (Kahlbaum), gelöst in 99,8%igem Alkohol, zugesetzt und kurz geschüttelt. Eine dem Milchsäuregehalt entsprechende Rotfärbung tritt auf, die genau nach 20 Minuten im AUTENRIETH-Colorimeter abgelesen wird. Empfindlichkeit 1 : 200 000; bei 1 : 400 000 tritt noch deutliche Rotfärbung auf. Die Konzentration der Schwefelsäure muß konstant sein, denn der Grad der Aldehydbildung ist von der Konzentration der Schwefelsäure abhängig. Die Entwicklung der Färbung ist abhängig von der Temperatur; am stärksten ist die Färbung bei 25°; höhere Temperaturen hemmen die Reaktionen.

An Stelle der Spezialschwefelsäure empfiehlt H. J. FUCHS<sup>3</sup> reine konz. MERCKsche Schwefelsäure (für Mikrokjeldahl) zu verwenden. Bei Verwendung einer 20%igen Veratrollösung und genannter Schwefelsäure im Originalmengenverhältnis ist der Nachweis von Acetaldehyd wie bei der Originalmethode möglich; die Empfindlichkeit ist auf das Doppelte gestiegen.

β) Bestimmung als Essigsäure nach P. SZEBERÉNYI<sup>4</sup>. Das Verfahren beruht darauf, daß Milchsäure unter gewissen Bedingungen durch Chromsäure nur bis zur Essigsäure oxydiert wird nach der Gleichung



Eine etwa 20—40 ccm N.-Lauge entsprechende — von Alkohol, Aldehyde, Ketonen und Essigsäure befreite — Milchsäurelösung wird in einem 500 ccm-Kolben mit 50%iger Chromsäurelösung im Überschuß (etwa 10—30 ccm) und 20 ccm verd. Schwefelsäure (1 : 1) versetzt, mit Wasser auf etwa 100 ccm verdünnt und 15 Minuten am Rückflußkühler gekocht. Ist alle Chromsäure verbraucht, die Lösung also grün geworden, so muß ein weiterer Zusatz von Chromsäurelösung erfolgen. Nach beendeter Oxydation und Abkühlung destilliert man die entstandene Essigsäure mit Wasserdampf ab und titriert sie im Destillat.

Da bei dieser Oxydation 3% der Milchsäure völlig zu Kohlensäure oxydiert werden, fallen die Ergebnisse um diesen Betrag zu niedrig aus; die gefundenen Gehalte müssen daher mit 1,03 multipliziert werden.

γ) Gasvolumetrische Bestimmung nach W. HÜBNER<sup>5</sup>. Milchsäure kann bestimmt werden durch Zersetzung mit konz. Schwefelsäure und Messung des dabei neben Acetaldehyd entwickelten Kohlenoxyds. 10 ccm einer Milchsäurelösung werden mit einem geringen Überschuß Barytlösung versetzt, auf dem Wasserbade 1/2 Stunde erhitzt und hierauf in einem Fraktionskölbchen bei mäßiger Wärme im Vakuum verdampft. Nachdem der Inhalt des Kölbchens

<sup>1</sup> Die Stärkelösung (0,5%) wird in der Weise hergestellt, daß 1 g Stärke und 4 g Zinkchlorid mit Wasser einige Zeit gekocht, auf 100 ccm aufgefüllt und filtriert werden.

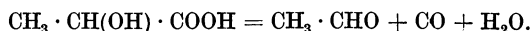
<sup>2</sup> B. MENDEL u. I. GOLDSCHIEDER: Biochem. Zeitschr. 1925, 164, 163.

<sup>3</sup> H. J. FUCHS: Biochem. Zeitschr. 1930, 217, 405.

<sup>4</sup> P. SZEBERÉNYI: Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 505.

<sup>5</sup> W. HÜBNER: Diss. Universität Bonn 1903. — Auf dem gleichen Prinzip beruhen die Verfahren von A. PARTHEIL: Arch. Pharm. 241, 433 und Z. 1902, 5, 1052 und von G. PARIS: Staz. sperim. agrar. ital. 1907, 40, 689; C. 1908, I, 773.

vollständig trocken ist, befestigt man das völlig erkaltete Kölbchen luftdicht an einem mit Wasser gefüllten Nitrometer. Der Hals des Fraktionskölbchens wird mit einem Tropftrichter versehen, durch den man zu dem Rückstand einige ccm konz. Schwefelsäure fließen läßt; darauf wird die Verbindung zwischen Kölbchen und Nitrometer hergestellt. Durch vorsichtiges Erhitzen mit einer kleinen BUNSEN-Flamme leitet man die Reaktion ein. Das sich entwickelnde Kohlenoxyd drängt eine entsprechende Menge Luft in das Nitrometer. Die Reaktion verläuft glatt und schnell; ihr Ende ist deutlich dadurch zu erkennen, daß sich das Reaktionsgemisch vollständig beruhigt. Um es von Schwefliger Säure und Kohlensäure zu befreien, wird das Gas mit 30%iger Natronlauge gewaschen, nach einstündigem Stehen das Volumen des gebildeten Kohlenoxydes bestimmt und unter Berücksichtigung von Temperatur und Luftdruck die Berechnung ausgeführt. Die Reaktion verläuft in dem Sinne, daß ein Molekül Kohlenoxyd einem Molekül Milchsäure entspricht gemäß der Gleichung



Nach R. MEISSNER<sup>1</sup> arbeitet man zweckmäßig im Kohlendioxidstrom, fängt ferner das Kohlenoxyd nicht in Wasser, sondern über 50%iger Kalilauge auf und leitet es zuletzt noch in ammoniakalische Kupferchlorürlösung, um etwaige Verunreinigungen auszuschalten.

d) **Bestimmung als Zinklactat.** Man verfährt nach E. BUCHNER und J. MEISENHEIMER<sup>2</sup>, wie folgt: Die auf Milchsäure zu prüfende — nötigenfalls mit Bleicarbonat gekochte, filtrierte und durch Schwefelwasserstoff entbleite — Lösung wird siedend mit überschüssigem Zinkcarbonat versetzt, filtriert, auf dem Wasserbade stark eingeeengt und vorsichtig — damit das Zinklactat nicht amorph ausfällt — mit Alkohol versetzt. Das sich krystallinisch ausscheidende Zinklactat wird abgesaugt, mit schwach verdünntem Alkohol ausgewaschen und als solches gewogen oder in Zinkoxyd übergeführt. Nötigenfalls behandelt man die Mutterlauge nochmals in ähnlicher Weise.

e) **Bestimmung als Bariumlactat.** Das von R. KUNZ<sup>3</sup> und W. MÖSLINGER<sup>4</sup> zur Bestimmung der Milchsäure im Wein angewendete Verfahren beruht auf der Löslichkeit des Bariumlactats in Alkohol. Aus dem alkohollöslichen Bariumlactat wird die Milchsäure entweder aus dem Bariumgehalt (R. KUNZ) oder der Aschenalkalität (W. MÖSLINGER) berechnet; siehe unter ζ). — M. RIPPER und F. WOHACK<sup>5</sup> haben das Verfahren von W. MÖSLINGER zu einem Mikroverfahren ausgearbeitet.

ζ) **Bestimmung der Milchsäure neben anderen organischen Säuren.** Seitdem durch R. KUNZ und W. MÖSLINGER nachgewiesen worden ist, daß Äpfelsäure im Wein in Milchsäure übergehen kann, ist die Bestimmung der Milchsäure, besonders im Wein recht häufig notwendig. Man trennt sie von den flüchtigen Säuren durch Destillation der letzteren und von den anderen organischen Säuren (Äpfel-, Wein-, Citronensäure) entweder durch Ausziehen des Säuregemisches mit Äther oder durch Fällern mit Bariumhydroxyd oder durch Oxydation zu Acetaldehyd oder Essigsäure. Es sind für ihre Bestimmung folgende Verfahren in Vorschlag gebracht, nämlich:

a) **Verfahren von R. KUNZ<sup>3</sup>.** Er versetzt 200 ccm der Säurelösung (z. B. Wein) mit Bariumhydroxyd bis zur alkalischen Reaktion, dampft auf  $\frac{2}{3}$  des Volumens ein, füllt den Rückstand auf 200 ccm auf, filtriert nach dem Durchmischen, dampft 150 ccm des Filtrats nach Sättigen mit Kohlensäure auf dem

<sup>1</sup> R. MEISSNER: Biochem. Zeitschr. 1914, 68, 175.

<sup>2</sup> E. BUCHNER u. J. MEISENHEIMER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1904, 37, 425.

<sup>3</sup> R. KUNZ: Z. 1901, 4, 673.

<sup>4</sup> W. MÖSLINGER: Z. 1901, 4, 1120.

<sup>5</sup> M. RIPPER u. F. WOHACK: Zeitschr. landw. Versuchsw. Österreich 1919, 22, 15.

Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein, zersetzt den Rückstand mit verd. Schwefelsäure und zieht ihn 18 Stunden lang in einem geeigneten Apparat (SCHACHERL) mit Äther aus. Der Ätherauszug wird mit etwa 30 ccm Wasser ausgeschüttelt, dann der Äther verjagt, der Rückstand unter Anwendung eines Wasserdampfstromes bis zu einer Destillatmenge von 600—800 ccm von flüchtigen Säuren befreit, mit etwas überschüssigem Bariumhydroxyd unter Anwendung von Phenolphthalein als Indicator versetzt, 15 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt und, falls noch alkalische Reaktion bestehen bleibt, mit Kohlensäure gesättigt. Darauf dampft man im Wasserbade bis auf 10 ccm ein, spült mit 40 ccm Wasser in einen Meßkolben von 150 ccm, füllt bis zur Marke mit Alkohol (95%) auf, mischt, filtriert, dampft bis zur Entfernung des Alkohols auf dem Wasserbade ein, säuert mit Salzsäure an, setzt Natriumsulfat hinzu und bestimmt das gefällte Bariumsulfat in üblicher Weise. 1 g Bariumsulfat = 0,7725 g Milchsäure.

b) Verfahren von W. MÖSLINGER<sup>1</sup>. Aus 50 oder 100 ccm der zu untersuchenden Säurelösung (z. B. Wein) werden mittels Wasserdampfes die flüchtigen Säuren abdestilliert und die zurückbleibende Flüssigkeit in einer Porzellanschale mit Barytwasser bis zur neutralen Reaktion gegen Lackmus abgesättigt. Nach dem Hinzufügen von 5—10 ccm 10%iger Bariumchloridlösung wird bis auf etwa 25 ccm eingedampft und mit einigen Tröpfchen Barytwasser aufs neue genaue Neutralität hergestellt. Man fügt vorsichtig in geringen Mengen unter Umrühren reinsten Alkohol (95%) hinzu, bis die Flüssigkeit etwa 70—80 ccm beträgt, und führt den Inhalt der Porzellanschale nunmehr unter Nachspülen mit Alkohol in einen 100 ccm-Kolben über, füllt mit Alkohol auf und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter, wobei der Trichter bedeckt gehalten wird. 80 ccm oder mehr des Filtrates werden unter Zusatz von etwas Wasser in einer Platinschale verdampft; der Rückstand wird alsdann vorsichtig verkohlt und — ohne die Asche weiß zu brennen, was überflüssig ist — seine Alkalität mit 0,5 N.-Salzsäure in bekannter Weise bestimmt und in ccm N.-Alkalilauge ausgedrückt. 1 ccm N.-Alkalität der Asche entspricht 0,090 g Milchsäure.

Zieht man es vor, die Mineralstoffe zu beseitigen, ehe man an die Überführung in die Bariumsalze und deren Trennung geht, so werden wiederum aus 50 oder 100 ccm der Säurelösung die flüchtigen Säuren abgetrieben, der Rückstand in der Schale mit etwas Weinsäure versetzt, wozu meist 0,2 bzw. 0,4 g ausreichen, und bis zum dünnen Sirup (d. h. bis auf wenige ccm) eingedampft. Man gießt den Rückstand in einen mit Glasstopfen versehenen, 50 ccm fassenden, graduierten Stehzyylinder, spült mit wenigen Tropfen Wasser, bis das Volumen der wäßrigen Flüssigkeit etwa 5 ccm beträgt, und darauf weiter mit kleinen Mengen von Alkohol (95%) nach, immer unter Umschütteln, bis die Flüssigkeit 30 ccm beträgt; alsdann fügt man zweimal je 10 ccm Äther hinzu, indem man jedesmal kräftig schüttelt. Das Gesamtvolumen beträgt nunmehr 50 ccm. Man schüttelt und läßt absitzen, bis die Flüssigkeit völlig klar geworden ist, gießt in eine Porzellanschale ab und spült mit Äther-Alkohol nach. Unter Zusatz von Wasser wird die Flüssigkeit nunmehr zunächst von Äther und Alkohol durch Eindampfen befreit, alsdann mit Barytwasser neutralisiert und — ohne Zusatz von Bariumchlorid — weiter verfahren wie oben.

A. PARTHEIL<sup>2</sup> hält das MÖSLINGERSche Verfahren schon deshalb für fehlerhaft, weil die Milchsäure bei der Destillation im Wasserdampfstrom nicht unflüchtig ist, daher mit den flüchtigen Säuren zum Teil verloren geht. Wenngleich R. KUNZ<sup>3</sup> diesen Verlust für unerheblich hält, so weist W. MÖSLINGER noch auf andere Fehlerquellen des Verfahrens von KUNZ hin, so daß es nicht als genau bezeichnet werden könne.

Nach einer vergleichenden Prüfung von J. TRUMMER<sup>4</sup> ist das Verfahren von KUNZ bei einigen Abänderungen in allen Fällen anwendbar, wenn es auch umständlicher als das von MÖSLINGER ist. Die Abscheidung der in Wasser unlöslichen Bariumsalze nach KUNZ ist besser mit heiß gesättigtem Barytwasser als mit gepulvertem Bariumhydroxyd auszuführen.

<sup>1</sup> W. MÖSLINGER: Z. 1901, 4, 1120.

<sup>2</sup> A. PARTHEIL: Z. 1902, 5, 1053.

<sup>3</sup> R. KUNZ: Z. 1903, 6, 728.

<sup>4</sup> J. TRUMMER: Zeitschr. landw. Versuchsw. Österreich 1908, 11, 492.



c) Sonstige Verfahren. Zur Bestimmung der Milchsäure neben anderen Säuren verwendet E. K. NELSON<sup>1</sup> Chininsulfat und (J. K. PHELPS und H. E. PALMER<sup>2</sup>) Guanidinsulfat. A. BELLET<sup>3</sup> oxydiert die Milchsäure mit Kaliumpermanganatlösung zu Acetaldehyd und bestimmt diesen durch Reduktion von alkalischer Silberlösung.

ζ) Mikrochemische Bestimmung. αα) Das Verfahren von O. v. FÜRTH und D. CHARNASS (S. 1100) ist von S. W. CLAUSEN<sup>4</sup> als Mikroverfahren ausgebildet worden:

Die etwa 0,5 mg Milchsäure enthaltende Lösung wird mit so viel 25%iger Schwefelsäure versetzt, daß die Konzentration davon etwa 0,5% beträgt. Dann gibt man 2 ccm 5%ige Mangansulfatlösung und etwas Talkum hinzu. Die Apparatur ist die gleiche wie für die Makrobestimmung nur entsprechend kleiner. Zur Oxydation verwendet man 0,002 N.-Kaliumpermanganatlösung, von der 40—50 Tropfen je Minute zugegeben werden. Bei 0,5 mg Milchsäure werden 10 ccm 0,02 N.-Bisulfatlösung vorgelegt. Die Oxydation dauert 20—25 Minuten. Die Titration der nicht gebundenen Bisulfatlösung erfolgt zunächst mit 0,02—0,04 N.-Jodlösung, zum Schlusse mit 0,002—0,0025 N.-Jodlösung mittels Mikrobürette unter Verwendung von Stärkelösung.

ββ) Bestimmung als Essigsäure nach K. HANSEN<sup>5</sup>. Die Milchsäure wird nach S. 1101 mit Chromsäure zu Essigsäure oxydiert.

In einem 100 ccm-ERLENMEYER-Kolben werden aus einer Mikrobürette 5 ccm Bichromatlösung (7,6237 g/l; 1 ccm = 3,5 mg Milchsäure) abgemessen und die Milchsäurelösung, die frei von anderen reduzierenden Stoffen sein muß, zugesetzt. Beträgt die zugesetzte Milchsäurelösung weniger als 5 ccm, so wird mit Wasser auf 5 ccm ergänzt. Aus einer Bürette werden 15 ccm 40%ige chemisch reine Schwefelsäure zugesetzt. Der Kolben wird mit einem Gummistopfen gut verschlossen und 1 Stunde in den Thermostaten bei 70° gesetzt. Temperaturschwankungen, die ± 5° nicht überschreiten, schaden nicht. Darauf wird mit 50 ccm Wasser verdünnt. Man setzt dann 2 ccm 10%ige Kaliumjodidlösung zu und titriert mit Natriumthiosulfatlösung aus der Mikrobürette mit Stärke als Indicator. Ein blinder Versuch muß ausgeführt werden, um die Menge des durch Schwefelsäure reduzierten Bichromats festzustellen. Die Milchsäure muß in reiner Lösung vorliegen. Bei einer Menge über 1 mg Milchsäure übersteigt der relative Fehler nicht 2%, bei geringeren Mengen (bis zu 0,4 mg) nicht 5%.

## 7. Äpfelsäure.



Als „Äpfelsäure“ ist hier lediglich die in der Natur vorkommende l-Äpfelsäure behandelt. Die Äpfelsäure (Oxybernsteinsäure) ist eine zweibasische Oxysäure. Sie ist sehr leicht löslich in Wasser und Alkohol. 100 Tle. Äther lösen bei 15° 8,4 Tle. l-Äpfelsäure. In verd. wäßriger Lösung zeigt Äpfelsäure schwache Linksdrehung, bei etwa 34% besteht Inaktivität, bei größeren Konzentrationen Rechtsdrehung, die durch Säuren, besonders durch Schwefelsäure, wieder in Linksdrehung übergeht. Das Drehungsvermögen in Aceton ist ziemlich konstant  $[\alpha]_D = -5,7^\circ$ . Über den Einfluß von Uran und Molybdänsäure auf das Drehungsvermögen siehe S. 1106.

Beim Erhitzen von Äpfelsäure auf 100° entsteht glasartige Malomalsäure  $[C_5H_7O_3(COOH_3)]^6$ . Bei mehrstündigem Kochen mit Salzsäure geht l-Äpfelsäure in Fumarsäure über, ebenso beim Erhitzen mit Wasser und einigen Tropfen Schwefelsäure auf 160°. Erhitzt man Äpfelsäure mit konz. Schwefelsäure oder Chlorzink, so entsteht zunächst neben Ameisensäure eine Aldehydsäure  $(HOOC \cdot CH_2 \cdot CHO)$ . — Konz. Jodwasserstoffsäure reduziert Äpfelsäure bei 130° unter Druck zu Bernsteinsäure. Mit Salpetersäure entsteht Oxalsäure; Oxydation mit

<sup>1</sup> E. K. NELSON: Journ. Assoc. official. agricult. Chemists 1926, 9, 331; C. 1926, II, 2207.

<sup>2</sup> J. K. PHELPS u. H. E. PALMER: Journ. Amer. Chem. Soc. 1917, 39, 136; C. 1917, I, 1032.

<sup>3</sup> A. BELLET: Bull. Soc. chim. France 1913, [4] 13, 565; C. 1913, II, 457.

<sup>4</sup> S. W. CLAUSEN: Journ. Biol. Chem. 1922, 52, 263; C. 1922, IV, 531. — Vgl. auch E. LEHNARTZ: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, 179, 1.

<sup>5</sup> K. HANSEN: Biochem. Zeitschr. 1926, 167, 58.

<sup>6</sup> P. WALDEN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1899, 32, 2706.

Permanganat liefert zunächst Oxalessigsäure. Durch heiße Permanganatlösung wird Äpfelsäure zu Kohlensäure oxydiert. Beim Kochen mit 20%iger Natronlauge entsteht Fumarsäure. Beim Schmelzen mit Kali werden Essig- und Oxalsäure gebildet. Die Fällung von Kupfer durch Alkalien wird durch l-Äpfelsäure verhindert.

### a) Nachweis.

**α) Nachweis als Fumarsäure.** Nach J. A. SANCHEZ<sup>1</sup> gibt Äpfelsäure beim Erhitzen im trockenen Reagensglase bei etwa 200° ein feinkrystallines Sublimat von Fumarsäure, die durch ihre Schwerlöslichkeit in kaltem Wasser und nach Zusatz von wenig Ammoniak durch das schwerlösliche Silbersalz auch neben Wein- und Citronensäure sicher zu erkennen ist. Vgl. S. 1042. Angewendet werden 0,02—0,05 g.

**β) Nachweis nach G. DENIGÈS<sup>2</sup>.** Die Reaktion beruht auf der Bildung der Quecksilberverbindung der Oxalessigsäure ( $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$ ). Fügt man zu einer verd. Äpfelsäurelösung 0,1 Mol einer Lösung von 5,0 g Mercuriacetat und 1 ccm Essigsäure in 100 ccm Wasser, erhitzt die filtrierte Mischung zum Sieden, entfernt vom Feuer und setzt sofort tropfenweise 2%ige Kaliumpermanganatlösung zu, so fällt ein weißer Niederschlag aus. Es lassen sich so noch 5 mg Äpfelsäure in 100 ccm Wasser nachweisen.

Citronensäure gibt die gleiche Reaktion.

**γ) Nachweis nach L. ROSENTHALER<sup>3</sup>.** Versetzt man 0,25 g Äpfelsäure in 1 ccm Wasser mit je 5 g Diazogemisch (4 Tle. 0,5%iger Sulfanilsäure [1 g Sulfanilsäure, 50 g 5 N.-Salzsäure, 150 g Wasser] und 1 Tl. 0,7%ige Natriumnitritlösung) und Natronlauge, so tritt bei Anwesenheit von Äpfelsäure sofort Braunfärbung auf, die schon nach 1 Minute in ein rasch intensiver werdendes Rot übergeht.

Bei Citronensäure tritt erst nach 10 Minuten eine sehr schwache Rosafärbung auf. In schwächeren Lösungen ist die Reaktion noch charakteristischer, weil dann Citronensäure nicht reagiert. Weinsäure stört die Reaktion nicht. In 1%iger Lösung ist noch 0,01 g Äpfelsäure nachweisbar.

H. SCHMALFUSS und K. KEITEL<sup>4</sup> haben diese Reaktion auch zum mikrochemischen Nachweis der Äpfelsäure empfohlen.

**δ) Fluorescenzreaktion nach S. A. CELSI<sup>5</sup>.** Im Probierröhrchen werden 2—3 Tropfen der Äpfelsäurelösung mit etwa 2 ccm konz. Schwefelsäure und ein wenig Resorcin etwa 5 Minuten im Wasserbade erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit 10 ccm Wasser versetzt und nach nochmaliger Abkühlung mit konz. Ammoniaklösung tropfenweise bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt. Will man die Reaktion als Ringreaktion ausführen, so behandelt man mit Ammoniak, ohne zu mischen, so daß zwei Schichten entstehen. Die schön blaue Fluorescenz gibt sich am besten im Sonnenlicht bei seitlicher Besichtigung über schwarzem Untergrund oder noch besser im Magnesiumlicht zu erkennen. Sie tritt sowohl bei der freien Säure als auch beim Natrium-, Kalium- und Calciumsalz ohne weiteres auf. Es läßt sich auf diese Weise noch 0,01 mg Äpfelsäure nachweisen.

Eine ähnliche blaue Fluorescenzreaktion tritt nach E. EEGRIWE<sup>6</sup> mit einer Lösung von 2,5 mg Naphthol in 100 ccm 96%iger Schwefelsäure ein, wenn man eine kleine Menge von Calciummalat mit einigen Kubikzentimetern des

<sup>1</sup> J. A. SANCHEZ: *Anales Assoc. quim. Argentina* 1926, 14, 356; C. 1927, II, 302.

<sup>2</sup> G. DENIGÈS: *Compt. rend. Paris* 1900, 130, 32; C. 1900, I, 328.

<sup>3</sup> L. ROSENTHALER: *Chem.-Ztg.* 1912, 36, 830.

<sup>4</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: *Zeitschr. physiol. Chem.* 1924, 138, 156.

<sup>5</sup> S. A. CELSI: *Quimica e Industria* 1926, 3, 205; C. 1926, II, 2207.

<sup>6</sup> E. EEGRIWE: *Zeitschr. analyt. Chem.* 1932, 89, 121.

Reagens erwärmt. Siehe S. 1110. 0,01 mg Äpfelsäure ist mit 1,5 ccm Reagens noch nachweisbar.

ε) **Sonstige Reaktionen.** αα) Nachweis durch Überführen in Hydrazid nach H. FRANZEN und E. SCHUHMACHER<sup>1</sup>. Äpfelsäurediäthylester wird mit der dreifachen Gewichtsmenge absol. Alkohol gelöst, ein Überschuß von Hydrazinhydrat hinzugefügt und das Gemisch  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem siedenden Wasserbade erhitzt, die farblose, kristalline Masse wird abgesaugt, mit Alkohol nachgewaschen und getrocknet. Schmp. 177—178°.

ββ) Kocht man nach PAPASOGLI-POLI<sup>2</sup> eine Lösung von Äpfelsäure mit etwas Schwefelsäure und Kaliumbichromat, so soll sich ein Geruch nach frischen Äpfeln (Aldehyd?) entwickeln.

γγ) Eine wäßrige Lösung von Äpfelsäure gibt mit Bleiacetat einen voluminösen flockigen Niederschlag, der allmählich kristallin wird, in kochendem Wasser, in welchem er sich etwas löst, harzartig zusammen schmilzt und dann beim Erkalten hart und spröde wird<sup>3</sup>.

δδ) Eine neutralisierte Lösung von Äpfelsäure, die Ammoniumchlorid enthält, wird durch Calciumchlorid selbst beim Kochen nicht gefällt, gibt aber auf Zusatz von 1—2 Volumen Alkohol einen Niederschlag, der beim Erwärmen in der alkoholischen Lösung in weiche Klümpchen übergeht, die beim Erkalten erhärten und dann unter Druck in ein kristallines Pulver zerfallen<sup>4</sup>.

**Mikrochemischer Nachweis.** Für den mikrochemischen Nachweis der Äpfelsäure eignen sich besonders folgende Verfahren:

α) Nachweis als Silbersalz. Siehe O. KLEIN und WERNER, S. 1049.

β) Für den Nachweis sehr kleiner Mengen eignet sich gut die Zersetzung zu Fumarsäure<sup>5</sup>. Zu dem Zweck sublimiert man recht langsam bei möglichst niedriger Temperatur. Den Beschlag der Fumarsäure löst man durch Erwärmen mit einem Tröpfchen Wasser teilweise auf. Bei dem Erkalten kristallisieren zugleich Nadelchen (40—60 μ), krumme Federn, Zweige und Ranken aus.

γ) Ferner kann zum Nachweise auch das Mikrobecherverfahren nach C. GRIEBEL (S. 1026) verwendet werden.

δ) H. SCHMALFUSS und K. KEITEL<sup>6</sup> verwenden die Reaktion von L. ROSENTHALER (S. 1105) zum mikrochemischen Nachweis. Versetzt man 1 Mikrotropfen Diazobenzolsulfosäure-Lösung mit einem Körnchen Äpfelsäure, so entsteht ein rotbrauner Ring.

## b) Bestimmung.

α) **Polarimetrische Bestimmung nach FR. AUERBACH und D. KRÜGER<sup>7</sup>.** Das Verfahren beruht auf der Erhöhung der Drehung der Äpfelsäure durch Zusatz von Uranacetat und Ammoniummolybdat unter Bildung entsprechender Komplexverbindungen. Die Linksdrehung einer wäßrigen 1%igen Lösung wird 229fach vergrößert, so daß für Lösungen bis 0,1 mol/l für die Uranyläpfelsäure ( $\text{HC}_4\text{H}_3\text{O}_5 \cdot \text{UO}_2$ ) das molekulare Drehungsvermögen  $[\text{M}] = -700^\circ$  beträgt. für die Molybdänäpfelsäure ist  $[\text{M}] = +1020^\circ$ . Das molekulare Drehungsvermögen der Uranylweinsäure steigt bis  $+650^\circ$  und das der Molybdänweinsäure beträgt  $+1044^\circ$ .

Ausführung der Bestimmung: Von der klaren, etwa 1%igen Lösung der Äpfelsäure, die als Bariummalat vorliegt, werden

1. 10 ccm mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt,

2. 20 ccm mit 2,5 ccm der Dinatriumcitratlösung und 3,5 g Uranylacetat 4 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt und sodann genau auf 25 ccm aufgefüllt,

<sup>1</sup> H. FRANZEN u. E. SCHUHMACHER: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 115, 9.

<sup>2</sup> PAPASOGLI-POLI: Zeitschr. analyt. Chem. 1883, 22, 97.

<sup>3</sup> BRACONNOT: Annales de Chimie et de Physique (II) 6, 254; 8, 155. — BEILSTEINS Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl., S. 424, 1921.

<sup>4</sup> BEILSTEINS Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl., S. 424, 1921.

<sup>5</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 338, 1922.

<sup>6</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 156.

<sup>7</sup> FR. AUERBACH u. D. KRÜGER: Z. 1923, 46, 97, 177 (dasselbst auch Angaben über die ältere Literatur). — Vgl. insbesondere P. A. YODER: Z. 1911, 22, 329. — P. B. DUNBAR u. R. F. BACON: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1911, 3, 826; C. 1912 I, 1148. — J. J. WILLAMAN: Journ. Amer. Chem. Soc. 1918, 40, 1.

3. 10 ccm mit 2 ccm Eisessig und etwa 10 ccm der Ammoniummolybdatlösung (jedenfalls mit soviel, daß 12,5 mmol Molybdän vorhanden sind) genau auf 25 ccm aufgefüllt.

Der Inhalt jedes der drei Kölbchen wird durch ein trockenes Filter in ein 200 mm-Polarisationsrohr filtriert. Sollte die Molybdänmischung durch niedere Molybdänoxyde blau gefärbt sein, so wird sie vor der Filtration bei Zimmertemperatur mit Tierkohle geschüttelt.

Tabelle 5. Ermittlung der Äpfelsäurekonzentration der **Uranmischung** aus dem abgelesenen Drehungswinkel.

$\alpha$  = abgelesener Drehungswinkel.

$c$  = mmol/l Äpfelsäure in der polarimetrisch gemessenen Lösung.

$F = c/\alpha$  = Faktor zur Berechnung der Konzentration aus dem abgelesenen Winkel. Temperatur 18—20°. 200 mm-Rohr. Natriumlicht.

| $-\alpha$ | $c$   | Diff. | $F$   | $-\alpha$ | $c$   | Diff. | $F$  | $-\alpha$ | $c$   | Diff. | $F$  |
|-----------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|------|-----------|-------|-------|------|
| 0,1°      | 1,05  | 75    | 10,50 | 1,6°      | 12,48 | 76    | 7,80 | 3,1°      | 23,89 | 76    | 7,71 |
| 0,2°      | 1,80  | 74    | 9,00  | 1,7°      | 13,24 | 77    | 7,79 | 3,2°      | 24,65 | 75    | 7,70 |
| 0,3°      | 2,54  | 75    | 8,47  | 1,8°      | 14,01 | 76    | 7,78 | 3,3°      | 25,40 | 75    | 7,70 |
| 0,4°      | 3,29  | 75    | 8,23  | 1,9°      | 14,77 | 76    | 7,77 | 3,4°      | 26,15 | 76    | 7,69 |
| 0,5°      | 4,04  | 76    | 8,08  | 2,0°      | 15,53 | 77    | 7,77 | 3,5°      | 26,91 | 75    | 7,69 |
| 0,6°      | 4,80  | 77    | 8,00  | 2,1°      | 16,30 | 76    | 7,76 | 3,6°      | 27,66 | 75    | 7,68 |
| 0,7°      | 5,57  | 77    | 7,96  | 2,2°      | 17,06 | 77    | 7,75 | 3,7°      | 28,41 | 75    | 7,68 |
| 0,8°      | 6,34  | 77    | 7,93  | 2,3°      | 17,83 | 76    | 7,75 | 3,8°      | 29,16 | 75    | 7,67 |
| 0,9°      | 7,11  | 77    | 7,90  | 2,4°      | 18,59 | 76    | 7,75 | 3,9°      | 29,91 | 75    | 7,67 |
| 1,0°      | 7,88  | 76    | 7,88  | 2,5°      | 19,35 | 76    | 7,74 | 4,0°      | 30,66 | 75    | 7,67 |
| 1,1°      | 8,64  | 77    | 7,86  | 2,6°      | 20,11 | 76    | 7,73 | 4,1°      | 31,41 | 75    | 7,66 |
| 1,2°      | 9,41  | 77    | 7,84  | 2,7°      | 20,87 | 76    | 7,73 | 4,2°      | 32,16 | 74    | 7,66 |
| 1,3°      | 10,18 | 76    | 7,83  | 2,8°      | 21,63 | 75    | 7,73 | 4,3°      | 32,90 | 74    | 7,65 |
| 1,4°      | 10,94 | 77    | 7,81  | 2,9°      | 22,38 | 76    | 7,72 | 4,4°      | 33,64 | 74    | 7,65 |
| 1,5°      | 11,71 | 77    | 7,81  | 3,0°      | 23,14 | 75    | 7,71 |           |       |       |      |

Tabelle 6. Ermittlung der Äpfelsäurekonzentration der **Molybdänmischung** aus dem abgelesenen Drehungswinkel.

$\alpha$  = abgelesener Drehungswinkel.

$c$  = mmol/l Äpfelsäure in der polarimetrisch gemessenen Lösung.

$F = c/\alpha$  = Faktor zur Berechnung der Konzentration aus dem abgelesenen Winkel. Temperatur 18—20°. 200 mm-Rohr. Natriumlicht.

| $+\alpha$ | $c$  | Diff. | $F$  | $+\alpha$ | $c$   | Diff. | $F$  | $+\alpha$ | $c$   | Diff. | $F$  |
|-----------|------|-------|------|-----------|-------|-------|------|-----------|-------|-------|------|
| 0,08°     | 0,13 |       | 1,63 | 1,5°      | 8,05  | 52    | 5,37 | 3,0°      | 15,56 | 48    | 5,18 |
| 0,10°     | 0,27 | 14    | 2,70 | 1,6°      | 8,57  | 51    | 5,36 | 3,1°      | 16,04 | 48    | 5,17 |
| 0,2°      | 0,94 | 67    | 4,70 | 1,7°      | 9,08  | 51    | 5,34 | 3,2°      | 16,52 | 48    | 5,16 |
| 0,3°      | 1,54 | 60    | 5,13 | 1,8°      | 9,59  | 51    | 5,33 | 3,3°      | 17,00 | 47    | 5,15 |
| 0,4°      | 2,13 | 59    | 5,33 | 1,9°      | 10,10 | 51    | 5,32 | 3,4°      | 17,47 | 47    | 5,13 |
| 0,5°      | 2,69 | 56    | 5,38 | 2,0°      | 10,61 | 50    | 5,30 | 3,5°      | 17,94 | 47    | 5,12 |
| 0,6°      | 3,25 | 55    | 5,41 | 2,1°      | 11,11 | 50    | 5,29 | 3,6°      | 18,41 | 47    | 5,11 |
| 0,7°      | 3,80 | 55    | 5,42 | 2,2°      | 11,61 | 50    | 5,27 | 3,7°      | 18,88 | 47    | 5,10 |
| 0,8°      | 4,35 | 55    | 5,43 | 2,3°      | 12,11 | 49    | 5,26 | 3,8°      | 19,35 | 47    | 5,09 |
| 0,9°      | 4,89 | 54    | 5,43 | 2,4°      | 12,60 | 49    | 5,25 | 3,9°      | 19,81 | 47    | 5,08 |
| 1,0°      | 5,42 | 54    | 5,42 | 2,5°      | 13,10 | 49    | 5,24 | 4,0°      | 20,28 | 46    | 5,07 |
| 1,1°      | 5,96 | 53    | 5,42 | 2,6°      | 13,59 | 49    | 5,23 | 4,1°      | 20,74 | 46    | 5,06 |
| 1,2°      | 6,49 | 52    | 5,41 | 2,7°      | 14,08 | 49    | 5,22 |           |       |       |      |
| 1,3°      | 7,01 | 52    | 5,39 | 2,8°      | 14,59 | 48    | 5,21 |           |       |       |      |
| 1,4°      | 7,53 | 52    | 5,38 | 2,9°      | 15,07 | 49    | 5,19 |           |       |       |      |

Die Ablesungen am Polarisationsapparat sind bei Natriumlicht oder bei weißem Licht, das durch Anwendung geeigneter Lichtfilter auf die spektrale Zusammensetzung des Natriumlichtes gebracht ist, bei der gewöhnlichen Zimmertemperatur von 15—20° auszuführen. Für jede Messungsreihe wird zunächst die Nullstellung des Apparates am Nullpunkt und nach Drehung um 180° durch je drei Ablesungen ermittelt, sodann der Drehungswinkel der Lösungen durch je drei Ablesungen vor und nach der Drehung um 180° bestimmt.

Berechnung. Von den bei Gegenwart von Uran und Molybdän beobachteten Winkeln ist der Drehungswinkel der Lösung ohne drehungssteigernden Stoff abzuziehen. Aus den so erhaltenen beiden Winkeln ( $\alpha$ ) wird aus den Tabellen 5 und 6 auf S. 1107 die Äpfelsäurekonzentration ( $c$ ) der polarimetrisch gemessenen Lösung entnommen.

**$\beta$ ) Bestimmung als Fumarsäure nach R. KUNZ<sup>1</sup>.** Äpfelsäure wird durch Natronlauge bei 120—130° quantitativ in Fumarsäure überführt. Man versetzt die wäßrige Lösung (etwa 1%ig) mit 10 ccm Natriumcarbonatlösung (1:9) und 10 ccm Natronlauge (1:9), dampft zur Trockne und erhitzt den Trockenrückstand während 3 Stunden in einem Trockenkasten auf 120—130°. Darauf wird in verd. Salzsäure gelöst und die Fumarsäure in einem kleinen SCHACHERLSchen Apparat mit Äther extrahiert. Die Fumarsäure wird durch Titration bestimmt.

**$\gamma$ ) Bestimmung als Calciummalat nach H. W. COWLES jr.<sup>2</sup>.** Das Verfahren beruht darauf, daß Äpfelsäure durch Calciumacetat in einer Lösung von 85%igem Alkohol quantitativ ausgefällt wird. 5 ccm Lösung werden mit 2 ccm Calciumacetatlösung (10%) und 100 ccm Alkohol (95%) verrührt und auf dem Wasserbade erwärmt, bis die überstehende Flüssigkeit klar ist. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit 85%igem Alkohol gewaschen, bis er frei von löslichen Calciumsalzen ist, darauf gegläht und zur Austreibung aller Kohlensäure mit einem Überschuß von 0,1 N.-Salzsäure gelinde erwärmt; Sieden ist zu vermeiden. Nach dem Abkühlen wird mit 0,1 N.-Natronlauge zurücktitriert.

**$\delta$ ) Bestimmung als Bariummalat nach M. Pozzi-Escot<sup>3</sup>.** Die Bestimmung als Calciummalat gibt ungenaue Werte, da Calciumacetat in 85%igem Alkohol unlöslich ist und sich mit dem Calciummalat niederschlägt. Zur Fällung nimmt man zweckmäßig eine gesättigte, schwach ammoniakalische Lösung von Bariumbromid in 96%igem oder absolutem Alkohol. Die zu analysierende Lösung muß vor dem Zusatz des Bariumbromids neutralisiert und zum Sirup eingedampft sein; Alkohol muß in sehr großem Überschuß vorhanden sein.

**$\epsilon$ ) Bestimmung als Palladium nach A. HILGER<sup>4</sup>.** Das Verfahren beruht auf dem Reduktionsvermögen der Äpfelsäure gegenüber Palladiumchlorid. 1 g Äpfelsäure reduziert aus Palladiumchloridlösung 0,294 g Palladium. Die neutrale wäßrige Lösung (100 ccm) wird in einem 500 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit 10 ccm 5%iger Palladiumchloridlösung vermischt und hierauf 10 Minuten im Sieden erhalten. Unter lebhafter Kohlensäureentwicklung erfolgt die Reduktion des Palladiumchlorids. Hat die Kohlensäureentwicklung aufgehört, so wird mit Salzsäure schwach angesäuert und das Erhitzen auf dem Wasserbade fortgesetzt, bis sich das Palladium zusammenballt und zu Boden setzt. Das ausgeschiedene sehr gut filtrierbare Metall wird durch ein ALLIHNsches Rohr filtriert, vollkommen ausgewaschen, getrocknet, im Kohlensäurestrom erhitzt und nach dem Erkalten zur Wägung gebracht.

Glycerin, Glykolsäure, Gerbstoff, ferner Farbstoffe und Zucker wirken ebenfalls reduzierend auf Palladiumchlorid.

<sup>1</sup> R. KUNZ: Z. 1903, 6, 728.

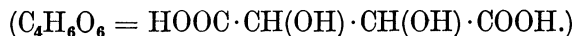
<sup>2</sup> H. W. COWLES jr.: Journ. Amer. Chem. Soc. 1908, 30, 1285; Z. 1909, 17, 415.

<sup>3</sup> M. POZZI-ESCOT: Bull. Soc. chim. Belg. 1908, 22, 413; C. 1909, I, 106.

<sup>4</sup> A. HILGER: Z. 1901, 4, 49.

ξ) Das titrimetrische Verfahren zur Bestimmung der Äpfelsäure nach W. MESTREZAT<sup>1</sup>, das auf der Oxydation der Äpfelsäure in saurer Lösung zu Ameisensäure und Kohlensäure beruht, scheint unsicher zu sein, da nach C. MICKO<sup>2</sup> Permanganat die Äpfelsäure keineswegs quantitativ oxydiert, nach A. HEIDUSCHKA<sup>3</sup> dagegen vollständig in Kohlensäure überführt.

## 8. Weinsäure.



Als „Weinsäure“ wird hier lediglich die in der Natur vorkommende d-Weinsäure behandelt und im Anschlusse daran (S. 1015) kurz die d,l-Weinsäure (Traubensäure).

Die Weinsäure (Dioxybernsteinsäure) ist leicht löslich in Wasser (100 ccm Wasser von 20° lösen 129 g) und Alkohol (100 ccm [85 Gew.-%] Alkohol lösen 25 g); 100 ccm gewöhnlicher Äther lösen 2 g und 100 ccm wasserfreier Äther 0,4 g Weinsäure. —  $[\alpha]^{20} = +14,83 - 0,149 p$ , wobei p den Prozentgehalt der Lösung an Weinsäure bedeutet. — Konz. Schwefelsäure verkohlt Weinsäure in der Hitze unter Entwicklung von Schwefeldioxyd.

Silbernitrat erzeugt in einer Lösung von freier Weinsäure keine Fällung, in Lösungen neutraler Tartrate aber sofort eine weiße, käsige Fällung von Silbertartrat, leicht löslich in Salpetersäure und Ammoniak und im Überschuß des Alkalitartrates. Durch Erwärmen der ammoniakalischen Silberlösung scheidet sich metallisches Silber ab. Calciumchlorid erzeugt beim tropfenweisen Hinzufügen zu einer konz. Lösung von neutralem Alkalitartrat bei Abwesenheit von Ammoniumsalzen einen weißen amorphen Niederschlag, der sich unter Bildung von leicht löslichem Calciumalkalitartrat wieder löst. Wenn genügend Calciumchlorid zur völligen Zersetzung des Alkalitartrates hinzugefügt worden ist, entsteht eine bleibende, flockige, bald krystallinisch werdende Fällung von neutralem Calciumtartrat. In nicht konz. Lösung entsteht durch Calciumchlorid oft im Anfange keine Fällung; nach längerem Stehen scheidet sich der Niederschlag krystallinisch ab. 100 Tle Wasser lösen bei 15° 0,0159 Tle. und siedend 0,0285 Tle. Calciumtartrat. In Essigsäure ist Calciumtartrat löslich (Unterschied von Calciumoxalat), ebenso auch in mäßig konz. kohlenstofffreier Kali- oder Natronlauge (1:5). Durch Kochen dieser Lösung scheidet sich das Calciumtartrat in Form eines voluminösen Niederschlages aus, der beim Erkalten wieder in Lösung geht. Ammoniumchlorid verhindert die Bildung des Calciumtartrates nicht. Kaliumsalze erzeugen in neutralen Lösungen von Alkalitartraten keine Fällung, wohl aber in essigsaurer Lösung. Das Kaliumbitartrat (Weinstein) ist in Wasser schwer löslich (100 ccm Wasser lösen bei 15° 0,443 und bei 20° 0,490 g des Salzes) ebenso in Essigsäure, leicht löslich dagegen in Mineralsäuren, Alkalilaugen und -carbonaten. Bleiacetat erzeugt in neutraler Lösung eine weiße, flockige Fällung von Bleitartrat, leicht löslich in Salpetersäure und Ammoniak.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an die Weinsäure folgende Reinheitsanforderungen:

10 ccm der wäßrigen Lösung (1 + 9) müssen nach Zusatz von 5 Tropfen Bariumnitratlösung innerhalb einer Viertelstunde klar bleiben (Schwefelsäure). — Die wäßrige Lösung (1 + 9) darf nach annäherndem Neutralisieren mit Ammoniakflüssigkeit weder durch Ammoniumoxalatlösung (Calciumsalze) noch durch Calciumsulfatlösung (Oxalsäure, Traubensäure) verändert werden. — Die in einem Kölbchen mit 13 ccm Ammoniakflüssigkeit versetzte Lösung von 5 g Weinsäure in 10 ccm Wasser darf nach Zusatz von 2 ccm verd. Essigsäure durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung nicht dunkler gefärbt werden als eine Mischung von 10 ccm verd. Bleiacetatlösung, die in 550 ccm 0,1 ccm Bleiacetatlösung enthält, und 3 Tropfen Natriumsulfidlösung. (Unzulässige Mengen Blei- und Kupfersalze.) Die Beobachtung ist in 2 gleichweiten und bis zur gleichen Höhe gefüllten Probierröhrchen vorzunehmen. — 0,2 g Weinsäure dürfen nach dem Verbrennen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

### a) Nachweis.

α) Nachweis als Kaliumbitartrat (Weinstein). Wird eine essigsaurer wäßrige Weinsäurelösung mit Kaliumchlorid versetzt, so entsteht eine krystalline

<sup>1</sup> W. MESTREZAT: Ann. Chim. analyt. appl. 1907, 12, 173.

<sup>2</sup> C. MICKO: Zeitschr. analyt. Chem. 1892, 31, 465.

<sup>3</sup> A. HEIDUSCHKA: Arch. Pharm. 1907, 245, 458.

Abscheidung von Kaliumbitartrat (Weinstein). Die Abscheidung des Salzes wird durch Reiben mit einem Glasstabe und Alkoholzusatz befördert. Vgl. S. 1111.

**β) Nachweis nach J. N. BRÖNSTED<sup>1</sup>.** Setzt man zu 5 ccm einer verd. Weinsäurelösung 1 ccm Calciumacetatlösung (5%) und 0,5 ccm 1-Weinsäurelösung (1%), so entsteht sofort ein Niederschlag von Calciumracemat. Der Niederschlag besteht aus kugel- und garbenförmigen Nadelaggregaten, der des linksweinsauren Calciums aus prismatischen Krystallen. Mit 0,1%igen Lösungen tritt die Ausscheidung sofort, mit 0,01%igen nach wenigen Minuten, mit 0,001%igen nach 1/2 Stunde ein.

**γ) Farbenreaktionen.** Für den Nachweis der Weinsäure ist ein Reihe von Farbenreaktionen vorgeschlagen, insbesondere folgende:

**αα) Reaktion mit Ferrosulfat und Wasserstoffsperoxyd.** Setzt man zu einer Weinsäurelösung Ferrosulfat und oxydiert mit Wasserstoffsperoxyd, so entsteht auf Zusatz von Alkalilauge Violettfärbung, die auf der Bildung von Dioxymaleinsäure beruht<sup>2</sup>. Äpfel-, Citronen-, Bernstein- und Oxalsäure geben die Reaktion nicht.

**ββ) Reaktion mit β-Naphthol und Pyrogallol.** Nach E. PIÑERUA<sup>3</sup> geben 50 mg Weinsäure oder Abdampfrückstand einer entsprechenden Lösung in einem Porzellanschälchen mit 10—15 Tropfen Naphtholreagens [20 mg β-Naphthol in 1 ccm konz. Schwefelsäure (d = 1,83)] anfangs eine Blaufärbung, dann beim weiteren Erhitzen Grünfärbung. Beim Versetzen der erkalteten Schmelze mit dem 15—20fachen Volumen Wasser entsteht eine gelbrote Lösung.

Werden nach L. EKKERT<sup>4</sup> 10 mg Weinsäure mit 20 mg Pyrogallol und 5 ccm konz. Schwefelsäure im Wasserbade erwärmt, so tritt starke Violettfärbung auf. Führt man die Reaktion mit β-Naphthol aus, so erhält man Blaugrünfärbung. Empfindlichkeit einige Hundertstel Milligramm.

**γγ) Nachweis nach E. MOHLER<sup>5</sup> bzw. G. DENIGÈS<sup>6</sup>.** Erwärmt man Weinsäure mit 1 ccm Resorcin-Schwefelsäure [2 g Resorcin in 100 ccm Wasser gelöst und mit 0,5 ccm konz. Schwefelsäure (d = 1,84) versetzt] auf 125—130°, so entsteht bei Gegenwart von Weinsäure Rotfärbung. 0,01 mg Weinsäure läßt sich noch nachweisen.

Oxydationsmittel, wie Nitrate, Nitrite, Chromate und Chlorate, welche die Reaktion ebenfalls geben, reduziert man vorher durch Zink und Schwefelsäure. Bei Gegenwart von Zucker scheidet man die Weinsäure vorher als Bleisalz ab.

**δδ) Nachweis nach E. EEGRIWE<sup>7</sup>.** In dem Calciumniederschlag der organischen Säuren kann die Weinsäure in folgender Weise nachgewiesen werden: Eine kleine Menge des auf Weinsäure zu prüfenden Calciumniederschlags wird in einem Reagensglase mit einigen Kubikzentimetern der Reagenslösung [0,01 g Gallussäure in 100 ccm Schwefelsäure (96%) versetzt und über freier Flamme auf 120—150° erhitzt. Bei sehr kleinen Niederschlagsmengen löst man das Calciumsalz auf dem Filter in 2 N.-Schwefelsäure und verwendet zum Nachweis einen Tropfen (0,05 ccm) des Filtrats. Je nach den Weinsäure- und Reagensmengen erhält man gelblichgrüne (0,002 mg) bis dunkelblaue Färbungen (0,5 mg). Der Nachweis von Weinsäure kann auf diese Weise auch neben Oxalat und Fluorid geführt werden, dagegen müssen komplexe Eisencyanide vorher abgetrennt werden.

Diese Reaktion, welche auf Aldehydbildung und nachfolgender Kondensation zwischen Aldehyd und Alkoholsäure zurückgeführt werden kann, fällt negativ aus mit Oxal-, Citronen-, Äpfel-, Bernstein-, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Milch-, Zimt-, Salicylsäure, dagegen positiv mit Glykol-, Tartron-, Glycerin- und Glyoxylsäure, auch mit Formaldehyd und Kohlenhydraten.

**εε) Nachweis nach C. BRAUN<sup>8</sup>.** Erhitzt man eine Lösung von Weinsäure mit einer Lösung von 1 g Kobalti-hexaminchlorid in 12 ccm Wasser zum Sieden und gibt Natronlauge zu, so geht die gelbe Färbung der Lösung in eine grüne und zuletzt blauviolette über.

Die Reaktion tritt auch in Gegenwart von Äpfelsäure, Ameisensäure, Benzoesäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Essig- und Oxalsäure ein.

<sup>1</sup> J. N. BRÖNSTED: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 15.

<sup>2</sup> H. J. H. FENTON: Journ. Amer. Chem. Soc. 1894, 65, 889; 1896, 69, 546. — Chem. News 43, 110; Zeitschr. analyt. Chem. 1882, 21, 123.

<sup>3</sup> E. PIÑERUA: Chem. New 75, 61; Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 713.

<sup>4</sup> L. EKKERT: Pharm. Zentralh. 1925, 66, 765.

<sup>5</sup> E. MOHLER: Zeitschr. analyt. Chem. 1889, 30, 120.

<sup>6</sup> G. DENIGÈS: Bull. Soc. chim. France 1909, 5, 323.

<sup>7</sup> E. EEGRIWE: Zeitschr. analyt. Chem. 1932, 89, 122.

<sup>8</sup> C. BRAUN: Zeitschr. analyt. Chem. 1868, 7, 349.

ζζ) Nachweis nach D. GANASSINI<sup>1</sup>. Erhitzt man die von Mineralsäuren freie Lösung der Weinsäure mit etwas überschüssiger Mennige kurze Zeit zum Kochen, dekantiert oder filtriert, fügt zum Filtrat ein gleiches Volumen einer wäßrigen 20%igen Kaliumrhodanidlösung und erhitzt zum Sieden, so schwärzt sich die Flüssigkeit allmählich unter Abscheidung von Schwefelblei. Die Reaktion tritt noch in 1%iger Weinsäurelösung ein. Nach A. TAGLIARINI<sup>2</sup> geben Oxal- und Citronensäure die gleiche Reaktion.

**Mikrochemischer Nachweis**<sup>3</sup>. Zum mikrochemischen Nachweis der Weinsäure eignen sich das Kaliumbitartrat, Silberbitartrat und Calciumtartrat.

Kaliumbitartrat fällt aus einigermaßen konz. Lösungen freier Weinsäure durch Kaliumacetat. Aus Lösungen normaler Tartrate erfolgt die Abscheidung kurze Zeit nach dem Zusatz von Kaliumacetat und Essigsäure, wenn sie mehr als 1% Weinsäure enthalten. Bei sehr verd. Lösungen muß Alkohol zugesetzt werden. Bei unvorsichtiger Anwendung dieses Mittels entstehen sternförmige Gruppen lanzettförmiger Krystalle, später rechtwinklige Täfelchen, Quadrate und Rechtecke; zuletzt bilden sich symmetrische Sechsecke.

Das Silbersalz scheidet sich aus Weinsäure und Tartratlösungen — bei diesen durch Versetzen mit Essigsäure — durch Zusatz von Silbersalzen aus. Der Niederschlag läßt sich aus heißem, mit Essigsäure oder mit wenig Salpetersäure angesäuertem Wasser umkrystallisieren. Leicht löslich in Ammoniakflüssigkeit, unlöslich in verd. Alkohol. Auf Zusatz von Alkohol scheiden sich beim flüchtigen Erhitzen auf 60° gut ausgebildete Krystalle aus. Die Krystalle des Silberbitartrats sind scharf ausgebildete Rauten mit einem spitzen Winkel von 65°, seltener gestreckte Sechsecke und Stäbchen. Besonders charakteristisch sind knieförmige Zwillinge in einem stumpfen Winkel von 129°. Die Fällung der Weinsäure mit Silbernitrat kann als sehr empfindliche und zugleich zuverlässige und charakteristische Reaktion empfohlen werden.

Zur Abscheidung des Calciumtartrates aus sehr verd. Lösungen erwärmt man nach dem Zusatz von Calciumchlorid und etwas Alkohol. Man erhält so auch besser ausgebildete Krystalle. Bei nicht zu schneller Abscheidung erhält man rhombische Prismen, die am Ende durch ein Doma zugespitzt sind. Aus konz. Lösungen erhält man sechseckige und trapezartige Täfelchen mit spitzem Winkel von 57° 30' bei den Trapezen und von 115° bei den Sechsecken.

F. KRAUSS und H. TAMPKE<sup>4</sup> sowie H. SCHMALFUSS und K. KEITEL<sup>5</sup> weisen Weinsäure mikrochemisch mit Resorcin-Schwefelsäure nach (S. 1148).

## b) Bestimmung.

α) Bestimmung als Kaliumbitartrat (Weinstein)<sup>6</sup>. αα) K. TÄUFEL und B. W. MARLOTH<sup>7</sup> schlagen folgende Ausführung des Verfahrens vor:

In einem mit Ausguß versehenen konischen Jenaer Becherglas von 250 ccm Inhalt, das bei 100 ccm eine Marke trägt, werden genau 100 ccm Untersuchungsflüssigkeit (0,3—1% Weinsäure enthaltend) nach Zugabe einiger Siedesteinchen vorsichtig bis etwa zur Hälfte eingedampft. Nach dem Abkühlen wird, nötigenfalls durch Zugabe von Alkalilauge oder Säure, deren Menge in einem besonderen Versuch ermittelt wird, auf den optimalen Wasserstoffexponenten  $p_H \sim 3,27$  eingestellt<sup>8</sup>. Sodann gibt man 20 ccm N.-Ameisensäure, 5 ccm N.-Kalilauge

<sup>1</sup> D. GANASSINI: Boll. chim. Farm. 1903, 42, 513; Z. 1904, 8, 558.

<sup>2</sup> A. TAGLIARINI: Boll. chim. Farm. 1907, 46, 493; C. 1907, II, 848.

<sup>3</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 340, 1922 u. EMICH: Mikrochemie 1926, 220.

<sup>4</sup> F. KRAUSS u. H. TAMPKE: Chem.-Ztg. 1921, 45, 521.

<sup>5</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 156.

<sup>6</sup> Über das Verfahren der amtlichen Anweisung „Zur chemischen Untersuchung des Weines“ siehe Zentralbl. f. d. Deutsche Reich 1920, 48, 1621; Gesetze und Verordnungen, betr. Lebensmittel, 1921, 13, 93. — Vgl. dazu P. BERG u. J. MÜLLER: Z. 1926, 52, 259, sowie F. SEILER: Z. 1932, 64, 285.

<sup>7</sup> K. TÄUFEL u. B. W. MARLOTH: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 161.

<sup>8</sup> Die Einstellung der Untersuchungsflüssigkeit auf den optimalen Wasserstoffexponenten  $p_H \sim 3,27$  kann colorimetrisch oder potentiometrisch erfolgen. Zur colorimetrischen Einstellung wird die zu analysierende Lösung, von der 100 ccm auf die Hälfte eingedampft werden, so lange mit Säure oder Alkalilauge versetzt, bis beim Tüpfeln auf einem besonders hergestellten Methylorangepapier ein lachsfarbener Farbton entsteht. Dieser entspricht einem  $p_H \sim 3,3$ . Darnach erfolgt der Zusatz des Ameisensäure-Formiat-Puffers sowie



und 10 g gepulvertes reines Kaliumchlorid hinzu. Nachdem letzteres durch Umrühren möglichst in Lösung gebracht ist, füllt man mit Wasser bis zur 100 ccm-Marke auf. Durch starkes, etwa 2 Minuten anhaltendes Reiben mit einem Glasstab an der Wand des Becherglases wird die Weinsteinabscheidung eingeleitet. Nun läßt man über Nacht (etwa 18 Stunden) bei Zimmertemperatur (20°) stehen und filtriert dann den Niederschlag an der Wasserstrahlpumpe, sehr zweckmäßig durch einen mit Papierfilterstoff<sup>1</sup> beschickten GOOCH-Tiegel, ab. Zum Überbringen und Auswaschen des Niederschlages bedient man sich insgesamt 30 ccm eines säurefreien Alkohols (66 Vol.-%), der so verteilt wird, daß der auf dem Filter gesammelte Niederschlag schließlich noch dreimal gewaschen werden kann. Der durch scharfes Absaugen ziemlich getrocknete Niederschlag wird samt Papierfiltermasse mit heißem alkalifreiem Wasser — hierfür reichen im allgemeinen 40—50 ccm aus — in das zur Fällung benutzte Becherglas zurückgespült. Unter dauerndem Umrühren wird bis zum beginnenden Sieden erhitzt; es erfolgt Auflösung des Weinstens. Die so erhaltene Lösung wird heiß, je nach der Menge des Weinstens, mit N.-, 0,5 N.- oder 0,2 N.-Alkalilauge unter Tüpfeln auf neutralem Lackmuspapier<sup>2</sup> titriert.

Der bei der Titration verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter Alkalilauge sind als Korrektur für den je 100 ccm Untersuchungsflüssigkeit in Lösung verbleibenden Weinstein 1,1 ccm 0,2 N.-Alkalilauge hinzuzufügen. Wurden z. B. bei der Titration des ausgeschiedenen Weinstens  $a$  ccm 0,2 N.-Alkalilauge verbraucht, so sind in 100 ccm der Untersuchungsflüssigkeit an Weinsäure ( $x$ ) in g enthalten:

$$x = 0,03 (a + 1,1).$$

$\beta\beta$ ) Bestimmung der Weinsäure nach E. BERNHAUER<sup>3</sup>. 50 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden mit 5 ccm Kaliumacetatlösung (40%), 2 ccm Eisessig und 100 ccm Alkohol (96%) versetzt; bis zur beginnenden Krystallisation des Weinstens wird die Glaswand mit einem Glasstab gerieben, und die Lösung dann verschlossen 15—18 Stunden stehen gelassen. Hierauf wird der Niederschlag im Glasfiltertiegel (Porengröße 5—7) abgesaugt, mit höchstens 35 ccm Alkohol (66 Vol.-%) ausgewaschen, mit etwa 50 ccm heißem Wasser in den Kolben zurückgespült und der Tiegel gut nachgewaschen. Der Niederschlag wird durch Kochen in Lösung gebracht, mit einigen Tropfen

von 10 g Kaliumchlorid und hierauf das Auffüllen auf 100 ccm. Das Methylorangepapier wird folgendermaßen hergestellt: In eine wäßrige 0,1%ige MethylorangeLösung werden etwa 1 cm breite Streifen eines geleimten Papiers (Manila-Schreibmaschinenpapier von Hartmann & Müller, Augsburg) gelegt. Nach einstündigem Verweilen in dieser Lösung werden die Streifen in einem von Säuren und Basen freien Raum freihängend getrocknet. Der unten intensiv gefärbte Rand wird abgeschnitten. Die Eichung auf den Farbton bei  $p_H \sim 3,3$  erfolgt mit einem SÖRENSENSEM Glykokoll-Salzsäure-Puffer [9 ccm 0,1 N.-Glykokollösung (die verwendete Glykokollösung enthält außerdem so viel Natriumchlorid, daß sie daran 0,1 normal ist) + 1 ccm 0,1 N.-Salzsäure]. Auf den von diesem Puffer hervorgerufenen lachsfarbenen Farbton wird bei der Einstellung der Untersuchungsflüssigkeit unter Einhaltung der gleichen Tropfengröße titriert.

Bei der Einstellung nach dem potentiometrischen Verfahren kann man die Anordnung der Chinhydronelektrode benutzen.

<sup>1</sup> Zur Herstellung des Papierfilterstoffes nach der „Amtlichen Anweisung“ schüttelt man 30 g Filtrierpapier mit 1 l Wasser unter Zusatz von 50 ccm 25%iger Salzsäure stark durch, filtriert auf der Nutsche ab und wäscht bis zur neutralen Reaktion mit heißem Wasser aus. Man verteilt den Brei auf 2 l Wasser und verwendet jedesmal 60 ccm des aufgeschüttelten Breies.

<sup>2</sup> Die Eichung des Lackmuspapiers auf den richtigen blauen Farbton wird so vorgenommen, daß auf 50 ccm Papierfilterstoff 3 Tropfen 0,2 N.-Alkalilauge zugesetzt werden. 1 Tropfen dieser Mischung gibt auf geeignetem neutralen Lackmuspapier eine deutliche blaue Färbung, deren Stärke bei der Durchführung zugrunde gelegt wird. Man kann auch direkt einige Tropfen Phenolphthaleinlösung zusetzen und auf schwaches Rosa titrieren.

<sup>3</sup> E. BERNHAUER: Österr. Chemiker-Ztg. 1928, 31, 4; C. 1928, I, 1211.

Azolithminlösung versetzt und mit 0,1 N.-Lauge titriert. Der Endpunkt wird durch Tüpfeln auf empfindlichem Lackmuspapier kontrolliert, wobei das Auftreten eines blauen Ringes als Endpunkt angesehen wird. 1 ccm 0,1 N.-Lauge entspricht 15,005 mg Weinsäure.

Die Methode versagt, wenn der Gehalt an Weinsäure geringer als 0,4% ist und der an Citronensäure 15% übersteigt. Jedoch kann man, sofern es die Citronensäuremenge gestattet, nach Konzentrieren der Probe auf entsprechenden Weinsäuregehalt die Methode anwenden. Empfindlichkeit auf 0,1% genau. Große Mengen organischer Säuren rufen größere Störungen hervor.

Von weiteren Methoden zur Bestimmung der Weinsäure als Weinstein siehe auch: „Methode GOLDENBERG 1907“: Zeitschr. analyt. Chem. 1908, 47, 57; 1923, 63, 111. — W. KLAPPROTH: Zeitschr. analyt. Chem. 1922, 61, 1. — A. HALENKE u. W. MÖSLINGER: Zeitschr. analyt. Chem. 1895, 34, 263. — P. KULISCH, P. KOHLMANN u. M. HÖPPNER: Zeitschr. angew. Chem. 1899, 12, 6. — P. CARLES: Z. 1909, 17, 421. — F. PERZIABOSCO: Staz. sperim. agrar. ital. 1915, 47, 802; C. 1915, I, 1093.

M. RIPPER und F. WOHACK (Zeitschr. landw. Versuchsw. Österr. 1919, 22, 15) haben ein mikrochemisches Verfahren der Weinsäurebestimmung als Kaliumbitartrat ausgearbeitet, das von 2 ccm Lösung (Wein) ausgeht und unter Verwendung der Zentrifuge sich im übrigen der Makromethode anschließt.

**β) Bestimmung als Calciumracemat nach A. KLING<sup>1</sup>.** Das Verfahren beruht auf der Unlöslichkeit des Calciumracemats, das entsteht, wenn man die Lösung von d-Weinsäure oder deren Salzen mit der ausreichenden Menge l-Weinsäure oder deren Salzen mischt und dann in schwach essigsaurer Lösung mit überschüssiger Calciumacetatlösung fällt.

Erforderliche Lösungen. A: 5%ige Diammoniumcitratlösung. — B: 2%ige l-Ammoniumtartratlösung, frei von d-Tartrat, mit je 1 5—6 ccm Formaldehydlösung. — C: Calciumacetatlösung, hergestellt durch Auflösen von 16 g Calciumcarbonat in 120 ccm Eisessig und Auffüllen auf 1000 ccm. — D: Lösung von 40 g Salzsäure (1,18) in 1000 ccm. — E: Lösung von 5 g Calciumcarbonat in 20 ccm Eisessig und 100 g Natriumacetat in Wasser zu 1000 ccm. — F: Etwa 1,6%ige Kaliumpermanganatlösung, eingestellt gegen reine Weinsäure oder Natriumbitartrat.

Ausführung der Bestimmung. Man gibt zu der fraglichen Weinsäurelösung, die auf 100 ccm gebracht ist, etwa 10—15 ccm Lösung A, sodann nacheinander 25 ccm Lösung B und 20 ccm Lösung C, mischt und läßt einige Stunden stehen. Enthält die Lösung beträchtliche Mengen Aluminium, Eisen und Antimon, so muß die Flüssigkeit 12 Stunden stehen bleiben. Man filtriert sodann den Niederschlag ab, wäscht ihn mit kaltem Wasser aus, durchstößt das Filter, spült den Niederschlag in ein Becherglas, setzt 20 ccm Lösung D hinzu, mit welcher man das Filter nachwäscht, verdünnt nach eingetretener Lösung auf 150 ccm und gibt 40—50 ccm der Lösung E hinzu. Man erwärmt die Flüssigkeit auf 80°, läßt sie darauf erkalten, filtriert den Niederschlag nach einigen Stunden ab, wäscht ihn aus, löst ihn auf dem Filter mit heißer 10 vol.-%iger Schwefelsäure und titriert die Lösung in der Siedehitze mit Lösung F. Die Hälfte der auf diese Weise gefundenen Weinsäuremenge entspricht dem Gehalt der Lösung an d-Weinsäure. — Das Verfahren soll ausgezeichnete Ergebnisse liefern.

**γ) Bestimmung als Bariumtartrat nach E. POZZI-ESCOT<sup>2</sup>.** Man macht die Lösung, die frei von Carbonaten sein muß, mit Ammoniak alkalisch und versetzt mit 40 ccm alkoholischer (75%) 0,1 N.-Bariumbromidlösung und 75 bis 100 ccm 95%igem Alkohol. Das Bariumtartrat, das in Alkohol unlöslich ist, filtriert man durch einen GOOCH-Tiegel, wäscht mit Alkohol aus und führt das Bariumtartrat in Carbonat oder Sulfat über und wägt diese.

Man kann aber auch im Filtrat das überschüssige Barium als Oxalat fällen; man filtriert dieses ab, wäscht mit möglichst wenig ammoniakalischem Wasser

<sup>1</sup> A. KLING: Bull. Soc. chim. France 1910, [4] 7, 567; C. 1910, II, 691. — A. KLING u. D. FLORENTIN: Bull. Soc. chim. France 1912, [4] 11, 886; C. 1912, II, 1700.

<sup>2</sup> E. POZZI-ESCOT: Compt. rend. Paris 1908, 146, 1031 u. Ann. chim. analyt. appl. 1908, 13, 266; Z. 1909, 18, 571.

nach, stößt das Filter durch, spült den Niederschlag mit warmem schwefelsäurehaltigem Wasser ab und titriert nach Zugabe überschüssiger Schwefelsäure die Oxalsäure mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung. Die Weinsäure berechnet sich nach der Formel  $(40 - n) \cdot 0,0075 \cdot 40$ , wobei  $n$  die ccm Permanganatlösung sind.

d) **Bestimmung als Magnesiumtartrat nach J. v. FERENTZY**<sup>1</sup>. An Stelle der früheren mangelhaften Methoden, in denen die Weinsäure in Form schwerlöslicher Salze gefällt wurde, wird ein basisches Magnesiumsalz der Weinsäure verwendet, das in einem Gemisch gleicher Teile Alkohol und Wasser vollkommen unlöslich ist, während die entsprechenden Salze der Äpfel- und Bernsteinsäure leicht löslich sind.

Zur Ausführung dampft man die Lösung, welche die drei Säuren enthält, ein, versetzt mit Alkohol, bis die Lösung 50% Alkohol enthält, gibt dem Weinsäuregehalt entsprechend Magnesiummischung, dann 10 ccm konz. Ammoniak hinzu, bringt den Alkoholgehalt der Lösung wieder auf 50%, filtriert nach 12stündigem Stehen den krystallinen Niederschlag und glüht. Das Gewicht des Magnesiumoxyds, multipliziert mit 1,875, ergibt die Menge der Weinsäure.

Nach Versuchen von L. GOWING-SCOPES<sup>2</sup> ist das Verfahren brauchbar und genau. Da jedoch das Trocknen und Glühen des Niederschlages des basischen Magnesiumtartrats schwer ohne Verlust möglich ist, empfiehlt es sich, das basische Magnesiumtartrat mit Kaliumpermanganatlösung zu titrieren. Zu dem Zwecke wird der gut getrocknete Niederschlag auf dem Filter mit etwa 400 ccm siedendem Wasser gelöst und auf etwa 200 ccm eingedampft. Zu dem vom Alkohol befreiten und abgekühlten Filtrat werden 10 ccm konz. Schwefelsäure gegeben, die Lösung auf 350—400 ccm verdünnt, dann auf 90° erhitzt und mit Permanganatlösung titriert, wobei dieses in sehr kleinen Mengen zugesetzt werden soll. Die Lösung soll zwischen 0,05 und 0,10 g Weinsäure enthalten.

e) **Polarimetrische Bestimmung.** Nach E. B. KENRICK und F. B. KENRICK<sup>3</sup> wird eine nicht über 2 g Weinsäure — aber keine anderen optisch aktiven Stoffe — enthaltene Menge der Substanz in einem 50 ccm-Kolben mit 3—4 ccm Wasser angefeuchtet und soviel konz. Ammoniaklösung (Spez. Gew. 0,924) zugesetzt, daß nach Neutralisation der Säure noch etwa 2 ccm Überschuß verbleiben. Die Lösung wird auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt, durch ein trockenes Filter filtriert und im 200 mm-Rohr polarisiert. Die vorhandene Menge Weinsäure ( $x$ ) errechnet sich nach der Gleichung:  $x = 0,00519 \cdot y$ , wobei  $y$  die Drehung in Minuten ausdrückt.

Enthält die Mischung unlösliches Calciumtartrat, so wird die gleiche Menge der Substanz mit 30 ccm Wasser und 20 Tropfen konz. Salzsäure gelinde erwärmt, bis Kalium- und Calciumtartrate gelöst sind. Zu der noch heißen Lösung werden 4 ccm konz. Ammoniaklösung und etwa 0,2 g Natriumphosphat, in wenig Wasser gelöst, zugegeben. Nach dem Abkühlen wird auf 50 ccm aufgefüllt, filtriert und wie oben polarisiert.

Wenn dieselbe Substanz nochmals nach dem ersten Verfahren behandelt wird, so erhält man aus der Differenz beider Bestimmungen die als Calciumtartrat vorhandene Menge Weinsäure.

Dieselben Verfasser geben ferner ein Verfahren an zur Bestimmung der Weinsäure in Substanzen, die neben dieser noch Zucker und andere optisch aktive Stoffe enthalten.

F. W. RICHARDSON und J. C. GREGORY<sup>4</sup> bedienen sich zur polarimetrischen Weinsäurebestimmung der starken Zunahme des optischen Drehungsvermögens durch die Bildung von Komplexverbindungen mit Molybdänsäure (S. 1106); FR. AUERBACH und D. KRÜGER<sup>5</sup> haben diese Bestimmung mit Uran und

<sup>1</sup> J. v. FERENTZY: Chem.-Ztg. 1907, **31**, 1118.

<sup>2</sup> L. GOWING-SCOPES: Analyst 1908, **33**, 315; C. 1908, II, 2038.

<sup>3</sup> E. B. KENRICK u. F. B. KENRICK: Journ. Amer. Chem. Soc. 1902, **24**, 928; Z. 1903, **6**, 886.

<sup>4</sup> F. W. RICHARDSON u. J. C. GREGORY: Journ. Soc. chem. Ind. 1903, **22**, 405; Z. 1904, **7**, 290.

<sup>5</sup> FR. AUERBACH u. D. KRÜGER: Z. 1923, **46**, 97.

Molybdänsäure ebenso wie bei Äpfelsäure (S. 1106) auch bei Weinsäure angewandt und gute Ergebnisse erhalten. — H. BESSON<sup>1</sup> bestimmt die Weinsäure durch Polarisation der Antimonkomplexverbindung.

ζ) **Sonstige Bestimmungsverfahren.** Von diesen sind die folgenden, wie z. B. die Oxydationsmethoden, nicht für Weinsäure eindeutig und daher nur für reine Weinsäurelösungen anwendbar, teils sind sie anscheinend noch nicht zuverlässig nachgeprüft.

Bestimmung als Zinktartrat nach H. LEY (Pharm. Ztg. 1904, **49**, 149; Z. 1904, **8**, 625).

Bestimmung als Wismuttartrat von A. C. CHAPMAN und P. WITTERIDGE (Analyst 1907, **32**, 163).

Oxydimetrische Verfahren von K. TÄUFEL und C. WAGNER (Zeitschr. analyt. Chem. 1925, **67**, 16), sowie M. WIKUL (Zeitschr. analyt. Chem. 1926, **68**, 45) mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure, ferner von W. MESTREZAT (Ann. Chim. analyt. appl. 1907, **12**, 173; C. 1907, **II**, 185), R. S. DEAN (Chem. News 1915, **112**, 154; Z. 1921, **42**, 50) und W. MEIGEN und J. SCHNERB (Zeitschr. angew. Chem. 1924, **37**, 208) mit Kaliumpermanganat, von R. STREBINGER und J. WOLFRAM (Österr. Chem.-Ztg. 1923, **26**, 156) mit Kaliumjodat und Schwefelsäure, und H. H. WILLARD und PH. YOUNG (Journ. Amer. Chem. Soc. 1930, **52**, 132; C. 1930, **I**, 2775) mit Cerisulfat und Schwefelsäure.

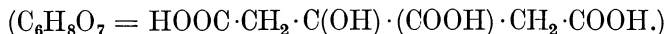
### Traubensäure.

Die Traubensäure (Racemische Weinsäure) krystallisiert mit 1 Molekül Wasser; die wasserfreie Säure schmilzt bei 205—206°.

Nachweis. Die freie Traubensäure wird durch Calciumchloridlösung und Gipswasser gefällt (Unterschied von der Weinsäure); das Calciumracemat (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Ca + 4 H<sub>2</sub>O) ist in Essigsäure und Ammoniumchloridlösung unlöslich; aus salzsaurer Lösung wird es durch Ammoniak gefällt (Unterschied vom Calciumtartrat).

Bestimmung neben Weinsäure nach A. F. HOLLEMAN<sup>2</sup>. Die Lösung wird auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft; nach 24 Stunden ist nur die Traubensäure auskrystallisiert; sie wird abfiltriert und gewogen. Das Filtrat wird etwas mit Wasser verdünnt, halbiert, die eine Hälfte mit Kalilauge neutralisiert, mit der anderen Hälfte vermischt und nach 24 Stunden das saure Kaliumtartrat abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und nach dem Trocknen gewogen. Im Filtrat findet sich etwa vorhandene Mesoweinsäure, die aus essigsaurer Lösung als Calciumsalz gefällt werden kann.

### 9. Citronensäure.



Die Citronensäure (Oxytricarballylsäure) ist dreibasisch. Sie ist leicht löslich in Wasser (100 Tle. kaltes Wasser lösen 133 Tle., siedendes Wasser 200 Tle.) und Alkohol (100 Tle. von etwa 85 Gew.-% lösen 100 Tle., absol. Alkohol 77 Tle.), aber nur wenig in Äther (100 Tle. lösen 2 Tle.). Sie ist optisch inaktiv. — Mit konz. Schwefelsäure erhitzt, zerfällt sie in Ameisensäure, Acetondicarbonsäure und Kohlenoxyd; die Acetondicarbonsäure zerfällt in Aceton und Kohlendioxyd. — Die Citrate der Alkalien sind leicht löslich in Wasser und bilden mit den Citraten der Schwermetalle, die an und für sich schwer- bis unlöslich sind, leicht lösliche komplexe Salze, in deren Lösung Alkalihydroxyde, Alkalicarbonate, Ammoniak keine Fällung hervorrufen. — Silbernitrat erzeugt in neutralen Lösungen eine flockige Fällung von Silbercitrat, leicht löslich in Salpetersäure und Ammoniak. Durch Erhitzen der ammoniakalischen Lösung auf 60° entsteht kein Silberspiegel (Unterschied von Weinsäure); erhitzt man

<sup>1</sup> H. BESSON: Journ. Pharm. et Chim. 1927, [8] 5, 539; C. 1927, **II**, 2216.

<sup>2</sup> A. F. HOLLEMAN: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1898, **17**, 66; C. 1898, **I**, 930. — Vgl. auch CHR. WINTHER: Zeitschr. physik. Chem. 1906, **56**, 465; C. 1906, **II**, 1673.

die Lösung zum Sieden, so fällt nach und nach Silber aus. — Barium- und Calciumchlorid erzeugen in neutraler Lösung keine Fällung; fügt man aber zu der mit überschüssigem Calciumchlorid versetzten Lösung Natronlauge, so entsteht sofort eine flockige Fällung von tertiärem Calciumcitrat, unlöslich in Kalilauge, leicht löslich in Ammoniumchlorid. Kocht man die ammoniumchloridhaltige Lösung, so scheidet sich das Calciumcitrat krystallinisch aus und ist nun nicht mehr löslich in Ammoniumchlorid. Kalkwasser im Überschuß erzeugt in neutralen Citratlösungen keine Fällung; in der Hitze fällt dreibasisches Calciumcitrat als flockigweißer Niederschlag aus, der sich beim Abkühlen der Lösung fast vollständig wieder löst.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an die Citronensäure folgende Reinheitsanforderungen:

Erhitzt man 5 ccm Citronensäurelösung (1 + 99) mit 1 ccm Quecksilbersulfatlösung zum Sieden und gibt dann einige Tropfen Kaliumpermanganatlösung (1 + 49) hinzu, so tritt Entfärbung ein, und es entsteht ein weißer Niederschlag. — Wird 1 g zerriebene Citronensäure in einem mit Schwefelsäure gereinigten Probierrohr mit 10 ccm Schwefelsäure 1 Stunde lang im Wasserbad auf 80—90° erhitzt, so darf sich die Flüssigkeit nur gelb, aber nicht braun oder schwarz färben (Weinsäure). — Die wäßrige Lösung (1 + 9) darf weder durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure) innerhalb einer halben Stunde, noch nach annäherndem Neutralisieren mit Ammoniakflüssigkeit durch Ammoniumoxalatlösung (Calciumsalze) verändert werden. — Wird die Lösung von 1 g Citronensäure in 10 ccm Wasser mit 5 ccm verd. Calciumchloridlösung versetzt, so darf innerhalb 1 Stunde keine Veränderung eintreten (Oxalsäure). — Die mit 12 ccm Ammoniakflüssigkeit versetzte Lösung von 5 g Citronensäure in 10 ccm Wasser darf durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung nicht dunkler gefärbt werden als eine Mischung von 10 ccm verd. Bleiacetatlösung, die in 550 ccm 0,1 ccm Bleiacetatlösung enthält, und 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Unzulässige Mengen Blei- und Kupfersalze). Die Beobachtung ist in 2 gleich weiten und bis zur gleichen Höhe gefüllten Probierrohren vorzunehmen. — 0,2 g Citronensäure dürfen nach dem Verbrennen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

### a) Nachweis.

**a) Nachweis als Pentabromaceton nach L. STAHR<sup>1</sup>.** Man löst weniger als 5 mg freier Citronensäure in einigen Kubikzentimetern Wasser, fügt 2—5 Tropfen 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung hinzu, erhitzt kurze Zeit auf 30—40° (nicht kochen!), bis zur beginnenden Abscheidung vom Mangansuperoxyd, gibt zu der Lösung 1—2 Tropfen 4%ige Ammoniumoxalatlösung und dann 1 ccm 10%ige Schwefelsäure, wobei die Flüssigkeit wasserhell wird. Nun setzt man einige Tropfen Bromwasser hinzu; es erfolgt jetzt deutliche krystallinische Fällung von Pentabromaceton.

Um eine Verdünnung der Lösung zu vermeiden, empfiehlt R. KUNZ<sup>2</sup> anstatt Bromwasser, einen Krystall von Kaliumbromid zu verwenden, der bei Gegenwart von Kaliumpermanganat und Schwefelsäure die nötige Brommenge liefert. Mit 0,02 mg Citronensäure erhält man noch eine Opalescenz.

Auch B. MERK<sup>3</sup> hat die STAHRsche Reaktion abgeändert. Citronensäure wird beim Erwärmen mit konz. Schwefelsäure in Kohlenoxyd und Acetondicarbonsäure gespalten. Verdünnt man die schwefelsaure Lösung vorsichtig mit Wasser und macht hierauf alkalisch, so entsteht auf Zusatz einiger Tropfen einer frisch bereiteten Nitroprussidnatriumlösung die bekannte Ketonfärbung, welche auf Zusatz von Essigsäure in die für Ketone charakteristische Farbe umschlägt. Bei Gegenwart von Weinsäure nimmt man statt reiner Schwefelsäure eine Mischung aus 3—4 Tln. Essigsäureanhydrid und 6—7 Tln. Schwefelsäure und läßt diese 5—10 Minuten lang bei 90—95° einwirken. 1 mg Citronensäure kann so leicht nachgewiesen werden.

<sup>1</sup> L. STAHR: Zeitschr. analyt. Chem. 1897, **36**, 195. — Vgl. ferner A. WÖHLK: Zeitschr. analyt. Chem. 1902, **41**, 94 u. O. KRUG u. J. RÄTTINGEN: Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1914, **49**, 28.

<sup>2</sup> R. KUNZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1915, **54**, 126. — Vgl. auch N. SCHOORL: Pharm. Weekbl. 1926, **63**, 1455.

<sup>3</sup> B. MERK: Pharm. Ztg. 1903, **48**, 894; C. 1903, **II**, 1396.

In ähnlicher Weise verfährt G. FAVREL<sup>1</sup>: Die Lösung, welche mindestens 5 mg Citronensäure oder Citrat enthalten muß, wird zur Trockne verdampft und in einem Reagensglase mit 3 ccm auf 100° erwärmter konz. Schwefelsäure ( $d = 1,84$ ) geschüttelt. Wenn die durch Zersetzung der gebildeten Ameisensäure erfolgte Entwicklung von Kohlenoxyd etwa 2 Minuten gedauert hat, kühlt man ab, gibt die dreifache Menge Wasser hinzu, kühlt wieder ab und schüttelt mit alkoholfreiem Äther aus. Beim Verdunsten des Äthers erhält man Nadeln von Acetondicarbonsäure. Zu ihrem Nachweis löst man sie in 3 ccm Wasser und gibt einen Teil der Lösung in stark verd. Eisenchloridlösung; man erhält eine rotviolette Färbung, welche durch Mineralsäuren verschwindet.

Der Vorschlag von T. C. N. BROEKSMIT<sup>2</sup>, das gebildete Aceton in Jodoform überzuführen, ist nicht empfehlenswert, weil Äpfelsäure dieselbe Reaktion gibt.

β) Nachweis als Acetondicarbonsäure. Nach G. DENIGÈS<sup>3</sup> verwendet man als Reagens eine Auflösung von 5 g Quecksilberoxyd in 20 ccm konz. Schwefelsäure und 100 ccm Wasser. 5 ccm der 1—2%igen Citronensäurelösung erhitzt man mit 1 ccm Reagens zum Sieden und fügt dann 3—10 Tropfen einer 0,1 N.-Permanganatlösung hinzu. Es entsteht sofort durch Oxydation eine weiße kryst. Fällung von Quecksilberacetondicarbonat. Die Reaktion ist sehr empfindlich. Noch bei Anwesenheit von 0,5 mg Citronensäure entsteht ein weißer Niederschlag. Die Reaktion ist aber keine spezifische Reaktion auf Citronensäure, da sie bei allen Ketonverbindungen eintritt.

Nach M. WAGENAAR<sup>4</sup> ist die Reaktion sehr brauchbar, auch in geklärten Flüssigkeiten organischen Ursprungs, falls keine wesentlichen Mengen Chloride vorhanden sind; ist letzteres der Fall, dann muß man sie durch Fällung mit Silbernitrat entfernen. Die entstandene Salzsäure ist, da sie mit dem Oxydationsmittel Chlor liefert, an der Oxydation der Citronensäure weiter als bis zur Acetondicarbonsäure beteiligt. Der amorphe oder mikrokrystallinische Niederschlag des Quecksilberacetondicarbonats läßt sich durch verd. Salzsäure in eine viel weniger voluminöse reguläre krystalline Verbindung überführen. Man arbeitet mit einer kleinen Menge von DENIGÈS Reagens und oxydiert mit verd. Permanganatlösung. — Nach I. M. KOLTHOFF<sup>5</sup> trifft die Beobachtung WAGENAARS zu, wenn gleichzeitig Weinsäure oder andere organische Säuren, die durch Kaliumpermanganat oxydiert werden, vorhanden sind. In diesem Fall entstehen mit Kaliumpermanganat Stoffe, die mit Chloriden Mercurchlorid bzw. andere Mercurverbindungen bilden. Ohne Entfernung der Chloride kann man die Reaktion ausführen, wenn man bei Zimmertemperatur folgenderweise arbeitet: Zu 10 ccm Lösung gibt man eine Spur Manganosulfat, 2—3 ccm DENIGÈS-Reagens und 10 Tropfen 2%iger Kaliumpermanganatlösung. Nach dem Umschütteln läßt man 15—30 Minuten stehen und entfärbt, falls die Lösung noch braun gefärbt ist, mit 3%iger Wasserstoffsuperoxydlösung. Bei Anwesenheit von Citronensäure entsteht ein weißer Niederschlag von Quecksilberacetondicarbonat. 20 mg Natriumchlorid und 400 mg Weinsäure neben 0,1% Citronensäure haben so praktisch keinen Einfluß. Ein Mercurchloridniederschlag läßt sich dadurch nachweisen, daß er sich bei Zusatz von  $\frac{1}{2}$  Volumen 4 N.-Salpetersäure löst.

O. v. SPINDLER<sup>6</sup> hat versucht, das Kaliumpermanganat bei der Reaktion nach DENIGÈS durch andere Oxydationsmittel zu ersetzen, aber nur Kaliumbichromat ist brauchbar. 0,5 g der Substanz werden in 10 ccm Wasser gelöst, 2 ccm Mercurisulfatlösung nach DENIGÈS zugesetzt, aufgeköcht, 2 ccm Bichromatlösung (0,5%) zugesetzt und ohne weiteres Erhitzen stehen gelassen. Bei reiner Citronensäure tritt alsbald ein hellgelber Niederschlag auf, und die Lösung bleibt tagelang hellgelb. Bei Gegenwart von Weinsäure wird die Flüssigkeit durch Braun allmählich grün, wodurch noch 5% Weinsäure in Citronensäure gut nachweisbar sind. Werden die Mengenverhältnisse geändert, so tritt auch bei Citronensäure nachträglich Oxydation und Grünfärbung der Lösung ein. Der Niederschlag wechselt seine Zusammensetzung recht erheblich.

γ) Farbenreaktionen. Für den Nachweis der Citronensäure sind unter anderem folgende Reaktionen vorgeschlagen:

αα) Nachweis mit Vanillin nach E. P. HÄUSSLER<sup>7</sup>. Dampft man eine Citronensäurelösung mit alkoholischer Vanillinlösung zur Trockne, setzt einige Tropfen verd. Schwefel-

<sup>1</sup> G. FAVREL: Ann. Chim. analyt. appl. 1908, 13, 177; C. 1908, II, 350.

<sup>2</sup> T. C. N. BROEKSMIT: Pharm. Weekbl. 1904, 41, 401; C. 1904, I, 1671.

<sup>3</sup> G. DENIGÈS: Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 718; 1901, 40, 121.

<sup>4</sup> M. WAGENAAR: Pharm. Weekbl. 1926, 63, 1293.

<sup>5</sup> I. M. KOLTHOFF: Pharm. Weekbl. 1926, 63, 1322, 1453.

<sup>6</sup> O. v. SPINDLER: Chem.-Ztg. 1904, 28, 15.

<sup>7</sup> E. P. HÄUSSLER: Chem.-Ztg. 1914, 38, 937.

säure zu und erwärmt 10—15 Minuten auf dem Wasserbade, so entsteht bei Gegenwart von Citronensäure eine stark violette Färbung. Der Rückstand löst sich in Wasser mit grüner Farbe, die nach Zusatz von Ammoniak in ein starkes Rot übergeht. Die Grenze der Empfindlichkeit liegt bei 1—2 mg Citronensäure; neben anderen organischen Säuren liegt sie bei 20—50 mg. Zucker und Eiweiß stören und müssen daher entfernt werden. Wein-, Äpfel-, Oxal-, Malon-, Benzoe-, Salicyl-, Essig-, Milch- und Bernsteinsäure geben diese Reaktion nicht.

ββ) Nachweis nach MEAN<sup>1</sup>. Erhitzt man Citronensäure mit 0,7 Tln. Glycerin bis zur Entwicklung von Acroleindämpfen, nimmt die Masse mit Ammoniak auf, verdampft letzteres durch gelindes Erwärmen und gibt dann tropfenweise eine Mischung von 1 Tl. rauchender Salpetersäure und 4 Tln. Wasser hinzu, so gibt Citronensäure eine grüne, beim Erwärmen in Blau übergehende Färbung. Weinsäure und Äpfelsäure geben diese Reaktion nicht.

γγ) Nachweis als Acetondicarbonsäure nach G. DENIGÈS (S. 1117). Die bei dieser Reaktion entstehende Acetondicarbonsäure kann nach E. BAIER und P. W. NEUMANN<sup>2</sup> nach Zersetzung des Quecksilberacetondicarbonats in 10% der Natriumchloridlösung nachgewiesen werden, indem man zu der Lösung einige Tropfen verd. Ferrichloridlösung zusetzt; bei Gegenwart von Citronensäure tritt eine himbeerrote Färbung von Eisenacetondicarbonat ein.

δδ) Nachweis mit Kobaltnitrat nach J. F. TOCHER<sup>3</sup>. Gibt man zu der Lösung einige ccm Kobaltnitratlösung und dann einen Überschuß von Natronlauge, so entsteht bei Gegenwart von Citronensäure eine tiefblaue Lösung und beim Kochen mit Calciumchlorid ein Niederschlag. Äpfelsäure gibt ebenfalls eine blaue Lösung aber keinen Niederschlag. Ameisen-, Essig-, Oxal- und Bernsteinsäure geben die Reaktion nicht, sondern einen blauen Niederschlag.

εε) Nachweis mit Titantrichlorid nach A. MONNIER<sup>4</sup>. Erhitzt man eine Alkalicitratlösung mit einer 0,8%igen Titantrichloridlösung, so entsteht eine Violettfärbung, die nach einiger Zeit, an der Oberfläche beginnend, verschwindet.

d) Biologischer Nachweis nach T. THUNBERG<sup>5</sup>. Das Verfahren eignet sich zum Nachweise minimalster Mengen Citronensäure, etwa 0,0084 mg (8,4 γ) in 1 ccm Flüssigkeit. Es beruht darauf, daß eine Methylenblaulösung durch eine Citrico-Dehydrogenase in Gegenwart von Citronensäure entfärbt wird. Über die Gewinnung des Enzyms aus den Samen von Cucumis sativa und die Ausführung der Bestimmung sei auf die Originalarbeit verwiesen.

e) Mikrochemischer Nachweis. Hierfür kommen vorwiegend folgende Verfahren zur Anwendung:

αα) Nachweis nach M. WAGENAAR<sup>6</sup>. Zu einem Tröpfchen der fraglichen Citronensäurelösung fügt man 1 Tropfen 0,1 N.-Jodlösung in Kaliumjodid und danach eine kleine Menge 30%ige Essigsäure. Man erwärmt vorsichtig auf dem Wasserbade und fügt 1 Tropfen 3%iger Kaliumpermanganatlösung hinzu. Bei Anwesenheit von Citronensäure entsteht sofort eine Wolke von weißen Krystallen von Pentajodacetone, die durch einen Tropfen Äther oder Äthylacetat vergrößert werden. An Stelle von Permanganat kann auch Bichromat verwendet werden. Wein-, Äpfel-, Bernstein-, Milch- und Oxalsäure geben die Reaktion nicht. 0,2 mg Citronensäure sind noch nachweisbar.

ββ) Nachweis mit Vanillin. Das Verfahren von E. P. HÄUSSLER (S. 1117) haben H. SCHMALFUSS und K. KEITEL<sup>7</sup> für den mikrochemischen Nachweis, wie folgt, abgeändert: 0,1 mg Citrat oder freie Citronensäure und 2 mg Vanillin werden auf einem Uhrglase mit 1 Mikrotropfen (10 mg) konz. Schwefelsäure versetzt und auf einem Becherglase mit siedendem Wasser erhitzt. Nach 3 Minuten tritt braunviolette, nach 7 Minuten violette, beim Versetzen der erkalteten Lösung mit 3 Mikrotropfen Wasser grüne und nach Zugabe von 7 Mikrotropfen Ammoniak rostbraune Färbung ein.

γγ) Nachweis als Aceton. Hierfür verwendet man am besten das Mikrobecherverfahren von C. GRIEBEL (S. 1026) und verfährt nach C. GRIEBEL und F. WEISS (S. 1150). Die Lösung darf nicht mehr als 0,5%ig sein. Es lassen sich noch 70 γ Citronensäure in 1 ccm nachweisen. Auch das Verfahren von A. I. KOGAN<sup>8</sup> ist zum mikrochemischen Nachweise von Citronensäure empfohlen worden.

<sup>1</sup> MEAN: Zeitschr. analyt. Chem. 1887, **26**, 642.

<sup>2</sup> E. BAIER u. P. W. NEUMANN: Z. 1915, **29**, 410.

<sup>3</sup> J. F. TOCHER: Pharmac. Journ. 1906, [4] **23**, 87; C. 1906, II, 823.

<sup>4</sup> A. MONNIER: Ann. Chim. analyt. appl. 1915, **20**, 1; C. 1916, I, 637.

<sup>5</sup> T. THUNBERG: Biochem. Zeitschr. 1929, **206**, 109.

<sup>6</sup> M. WAGENAAR: Pharm. Weekbl. 1927, **64**, 1135.

<sup>7</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, **138**, 156.

<sup>8</sup> A. I. KOGAN: Zeitschr. analyt. Chem. 1930, **80**, 112.

### b) Bestimmung.

Von den Methoden zur Bestimmung der Citronensäure beruht die erste Gruppe auf der Abscheidung der Citronensäure in Form unlöslicher Salze; sie ist nur dann anwendbar, wenn keine Stoffe zugegen sind, oder wenn solche vorher entfernt sind, die durch Alkohol und Calciumsalze gefällt werden; andererseits sind diese Verfahren geeignet, um die Citronensäure aus Lösungen zu entfernen, die bei den Oxydationsmethoden störende Stoffe enthalten. Die zweite Gruppe beruht auf der Oxydation der Citronensäure und Bestimmung der dabei entstehenden Stoffe: Aceton, Acetondicarbonsäure und Pentabrom-aceton.

**a) Bestimmung als Calciumcitrat.** Die Methode beruht auf der Bildung eines Calciumcitrates, das sich beim Erwärmen aus 40% alkoholischer Flüssigkeit krystallinisch abscheidet und in dieser Flüssigkeit sehr schwer löslich ist. Andere durch Calciumchlorid und Alkohol fällbare Stoffe dürfen natürlich in der Lösung nicht vorhanden sein bzw. müssen daraus entfernt werden. — B. BLEYER und J. SCHWAIBOLD<sup>1</sup> empfehlen folgende Ausführung der Bestimmung: Liegt die Citronensäure als freie Säure in wäßriger Lösung vor, so wird sie unter Zugabe von 1—2 Tropfen Phenolphthaleinlösung mit 0,1 N.-Natronlauge genau neutralisiert; liegt sie als Salz in neutraler Lösung vor, so kann diese ohne Vorbehandlung zur Bestimmung benutzt werden. Zu der auf dem Wasserbade vorgewärmten citronensäurehaltigen Flüssigkeit (0,05—0,3 g Citronensäure enthaltend) gibt man etwa die gleiche Menge 96%igen Alkohol hinzu. Dann wird nochmals kurze Zeit auf dem Wasserbade erwärmt, bis sich Tropfen kondensierten Alkohols an dem das Becherglas bedeckenden Uhr-gläse bilden; sodann wird unter Umrührung die Calciumchloridlösung (20%) im Überschuß langsam zugegeben, die Reaktionsflüssigkeit im Wasserbade nochmals kurz erwärmt, beiseite gestellt, und nach vollständigem Erkalten und Absitzen des Niederschlages durch einen bei 85° vorgetrockneten, gewogenen GOOCH-Tiegel filtriert. Der Niederschlag wird im Lufttrockenschrank bei 85° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und entspricht dann der Formel  $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; er ergibt, mit 0,6735 multipliziert, den Gehalt an wasserfreier Citronensäure ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ). Diese Bestimmung ist der als Calciumoxyd vorzuziehen. Die Fehlergrenze beträgt höchstens  $\pm 0,2\%$ .

Nach Versuchen von W. BARTELS<sup>2</sup> versagt diese Methode, wenn die Temperatur bei der Fällung nicht hoch genug ist und wenn ein großer Überschuß von Calciumchlorid verwendet wird. Befriedigende Ergebnisse erhält man bei einer Temperatur von etwa 80°. Die störende Wirkung eines großen Überschusses an Calciumchlorid kann durch einen Zusatz von Ammoniak beseitigt werden. Es lassen sich so 2 mg Citronensäure nur unsicher, 4 mg und mehr in 50 ccm einwandfrei bestimmen.

Die Fällung als Bariumcitrat ist nach W. BARTELS<sup>2</sup> zur unmittelbaren Wägung des Niederschlages nicht geeignet, weil sie nur in ammoniakalischer Lösung vollständig ist und daher auch Bariumcarbonat und andere Stoffe mitgefällt werden; sie ist aber besonders geeignet, um die Citronensäure aus Lösungen abzuscheiden, welche bei den nachfolgenden Oxydationsmethoden störende Stoffe enthalten.

**β) Bestimmung als Aceton.** Die Arbeitsweisen nach A. I. KOGAN<sup>3</sup> und nach W. BARTELS<sup>2</sup> beruhen auf empirischer Grundlage; die Umsetzung erfolgt nicht nach stöchiometrischen Verhältnissen. K. TÄUFEL und F. MAYR<sup>4</sup> dagegen

<sup>1</sup> B. BLEYER u. J. SCHWAIBOLD: *Milchw. Forsch.* 1925, 2, 260. — Vgl. auch die kritische Arbeit über den Nachweis und die Bestimmung der Citronensäure im Wein von O. REICHARD: *Z.* 1926, 51, 282.

<sup>2</sup> W. BARTELS: *Z.* 1933, 65, 1.

<sup>3</sup> A. I. KOGAN: *Zeitschr. analyt. Chem.* 1930, 80, 112.

<sup>4</sup> K. TÄUFEL u. F. MAYR: *Zeitschr. analyt. Chem.* 1933, 93, 1.



haben in nachfolgendem Verfahren die Überführung der Citronensäure in Aceton zu einem stöchiometrischen Ablauf gebracht und auf diese Weise den zufälligen Einfluß gewisser Versuchsbedingungen ausgeschlossen.

Zur Ausführung der Bestimmung wird die Apparatur in Abb. 6 verwendet.

Der Destillationskolben (a) aus Jenaer Glas (250 ccm Inhalt) ist unter Verwendung eines Glasschliffs (b) verbunden mit einem Destillationsaufsatz, bestehend aus einem Tropftrichter (c) mit Glashahn und aus einer Kugel (d), die das Überspritzen von Flüssigkeitsteilchen verhindern soll. Das Ablaufrohr (e) des Tropftrichters ist in den erweiterten Teil des Destillationsrohres, das die Fortsetzung des hohlen Glasschliffstopfens (b) bildet, eingeführt und verschmolzen, so daß man während der Destillation Flüssigkeit in den Kolben fließen lassen kann. Oberhalb dieser Stelle befindet sich im aufsteigenden Destillationsrohr (f), das nicht zu eng sein darf, die erwähnte Kugel (d). Anschließend daran biegt das Rohr schräg seitlich nach abwärts, um nach nochmaliger Biegung zur Senkrechten in einen Schlangenkühler (g) einzumünden; auch an dieser Stelle ist eine Glasschliffverbindung angebracht. Zwecks leichter Reinigung und um die durch die Glasschliffe bewirkte Starrheit der Apparatur etwas zu mildern, ist die Destillationsröhre im schräg abfallenden Teil durch die Glasschliffverbindung (h) unterbrochen. Am Kühlerende wird (ebenfalls mit Glasschliff) ein Vorstoß (i) angesetzt, dessen Rohr in die in der Vorlage (k) befindliche Flüssigkeit eintaucht. Die Vorlage (SENDTNER-, bzw. ERLÉNMEYER-Kolben), die während des Versuches gekühlt werden soll, ist mittels Gummistopfens mit dem Vorstoß verbunden.

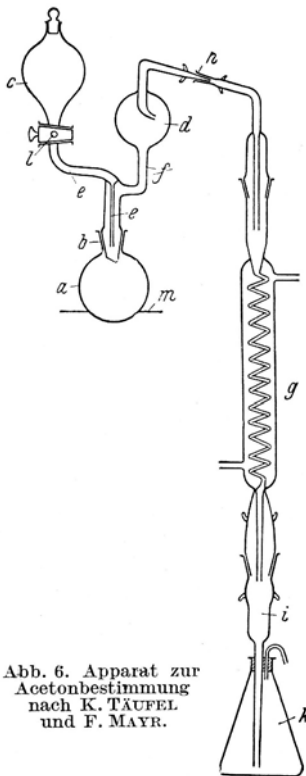


Abb. 6. Apparat zur Acetonbestimmung nach K. TÄUFEL und F. MAYR.

Um das Zutropfen der Permanganatlösung bequem und fein regulieren zu können, empfiehlt es sich, das Loch des Glashahnzapfens (l) mit einer Dreikantfeile auf beiden Seiten in entsprechend gleichmäßig (Richtung senkrecht zur Zapfenlänge) verlaufender Weise einzufeilen. Das Rohr des Tropftrichters soll ferner an der Spitze sehr eng<sup>1</sup> auslaufen. Der Destillationskolben sitzt zweckmäßig auf einer Asbestplatte (m), die mit einer entsprechenden Öffnung versehen ist. Der verwendete Schlangenkühler besitzt eine Länge von rund 30 cm.

**Ausführung.** Man gibt die citronensäurehaltige Untersuchungsflüssigkeit in den Destillationskolben und versetzt mit so viel Wasser, daß das Gesamtvolumen zwischen 50—100 ccm beträgt. Auf je 50 ccm Volumen rechnet man 2—3 ccm Pufferlösung<sup>2</sup>. Ferner werden einige Siedesteinchen (Tonscherben) zugegeben. Der Normalschliffkolben (an der Schliffstelle am besten nicht eingefettet, sondern nur angefeuchtet) wird unter leichtem Druck an den Destillationsaufsatz gedreht. Der Tropftrichter wird mit 0,05%iger Kaliumpermanganatlösung, die mit Eis gekühlte Vorlage mit einer genau abgemessenen Menge etwa 2 N.-Kalilauge (weil ihr Jodverbrauch im Leerversuch ermittelt werden muß) beschickt (etwa 15 ccm). Dann wird zum Sieden erhitzt. Erst nachdem die Luft vertrieben ist, öffnet man vorsichtig den Hahn des Tropftrichters und läßt die Permanganatlösung (etwa 1 Tropfen in der Sekunde) zur Destillationsflüssigkeit treten. Das Eintropfen, von dem das Ergebnis stark abhängig ist,

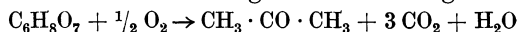
<sup>1</sup> Im Verein mit der sehr verdünnten (0,05%igen) Kaliumpermanganatlösung wird es dadurch möglich, die Oxydationsflüssigkeit in langsamer Tropfenfolge gleichmäßig zuzusetzen, während bei Anwendung der 1,5%igen Permanganatlösung nach A. I. KOGAN und W. BARTELS alle 5 Minuten je 10 Tropfen während des Siedens hinzugefügt werden müssen.

<sup>2</sup> Pufferlösung: 49,03 g Phosphorsäure (100%ig) bzw. die entsprechende Menge eines schwächeren Präparates und 68,08 g Kaliummonophosphat (nach S. P. L. SOERENSEN) in Wasser zu 4 l gelöst.

darf nur so rasch vor sich gehen, daß bis zum Einfallen des nächsten Tropfens Entfärbung eingetreten ist. Man oxydiert so lange, bis die Permanganatfarbe bzw. das ausgeschiedene Mangandioxyd mindestens 5 Minuten lang bestehen bleibt. Ohne weiteren Zusatz von Permanganat wird nun die Destillation sicherheitshalber noch 15—20 Minuten fortgesetzt. Der Kühler wird mit Wasser in die Vorlage hinein nachgespült. Im Destillat wird das Aceton jodometrisch nach MESSINGER (S. 1063) bestimmt.

Zu diesem Behufe gibt man zu der acetonhaltigen alkalischen Lösung tropfenweise unter beständigem Umschütteln so viel 0,1 N.-Jodlösung, daß nach Beendigung des Umsatzes mindestens  $\frac{1}{5}$  der angewendeten Menge im Überschuß bleibt<sup>1</sup>. Dann wird der Kolben verschlossen etwa 20—30 Minuten — bei kleiner Menge Citronensäure entsprechend länger — unter öfterem Umschwenken stehen gelassen. Darauf säuert man mit der 25%igen Schwefelsäure (etwa 8—10 ccm) an und titriert das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Thiosulfatlösung nach Zugabe von 2—3 ccm Stärkelösung (1%) zurück. Der Leerwert der verwendeten Kalilauge ist in Rechnung zu stellen.

Die Reaktionen verlaufen nach folgenden Gleichungen:



1 ccm 0,1 N.-Jodlösung entspricht 3,20 mg wasserfreier und 3,50 mg kryst. Citronensäure ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

**γ) Bestimmung als Acetondicarbonsäure.** αα) Titrimetrische Bestimmung. Die von L. GOWING-SCOPES<sup>2</sup> beschriebene, von B. BLEYER und J. SCHWAIBOLD<sup>3</sup> verbesserte Bestimmungsmethode beruht auf der Oxydation der Citronensäure zu Acetondicarbonsäure und Abscheidung dieser Verbindung als unlösliche komplexe Quecksilberverbindung (G. DENIGÈS Reaktion, S. 1117). Das erforderliche Reagens besteht aus 51 g Quecksilbernitrat, 51 g Mangano-nitrat und 68 ccm Salpetersäure (70%), die mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt werden; wenn nötig, wird filtriert.

Ausführung. Die zu untersuchende neutrale Flüssigkeit wird in einem 250 ccm fassenden ERLÉNMEYER-Kolben auf etwa 150 ccm aufgefüllt. Auf etwa 0,05 g vorhandene Citronensäure werden etwa 10 ccm des obigen Reagens zugegeben; eine geringere Menge verschlechtert das Ergebnis, ein Überschuß davon ist nicht von Nachteil. Die Lösung wird sodann am Rückflußkühler 3 Stunden in gelindem Sieden erhalten. Darauf wird die noch warme Flüssigkeit durch einen GOOCH-Tiegel filtriert. Die am Glase haftenden Reste lassen sich mittels einer sehr verd. Lösung von Salpetersäure durch Wischen mit einer Gummifahne leicht entfernen. Nach reichlichem Waschen mit Wasser wird der im Tiegel enthaltene Niederschlag mit konz. Salpetersäure in Lösung gebracht. Bei größeren Mengen Niederschlag bringt man die obere Asbestschicht samt der Substanz in einen ERLÉNMEYER-Kolben und löst den Niederschlag unter Erwärmen mit starker Salpetersäure. Die auf etwa 100 ccm verd. Lösung des Niederschlages wird nun mit einer konz. Kaliumpermanganatlösung versetzt, bis die violette Farbe einige Minuten bestehen bleibt; das überschüssige Permanganat bzw. ausgeschiedene Mangandioxydhydrat wird durch konz. Ferrosulfatlösung entfernt, so daß die Flüssigkeit wieder vollkommen farblos wird. Nach Zugabe von 1 ccm gesättigter Eisenammoniumalaunlösung wird mit 0,1 N.-Ammoniumrhodanidlösung auf bleibende, hellbraune Färbung titriert. 1 ccm 0,1 N.-Ammoniumrhodanidlösung entspricht 0,00298 g Citronensäure.

<sup>1</sup> Wenn die erwartete Menge Citronensäure 25 mg nicht übersteigt, reichen 10 ccm 0,1 N.-Jodlösung aus.

<sup>2</sup> L. GOWING-SCOPES: *Analyst* 1913, **38**, 12.

<sup>3</sup> B. BLEYER u. J. SCHWAIBOLD: *Milchw. Forsch.* 1925, **2**, 260.

Man erhält mindestens 98,5% der tatsächlich vorhandenen Citronensäure. Die gefundenen Werte liegen unter und über den tatsächlichen Werten. Die Methode ist nicht so genau wie die Bestimmung als Calciumcitrat und erleidet auch durch Beimengungen leichter Störungen; jedoch liefert sie auch bei der Bestimmung sehr geringer Mengen Citronensäure (0,01 g und weniger) befriedigende Ergebnisse.

$\beta\beta$ ) Destillationsverfahren nach B. BLEYER und J. SCHWAIBOLD<sup>1</sup>. Die Methode beruht auf der Oxydation der Citronensäure durch Kaliumpermanganatlösung zu Aceton, dessen quantitative Gewinnung durch sofortige Destillation und der Abscheidung des Acetons als unlösliche, komplexe Acetonquecksilberverbindung. Das erforderliche DENIGÈSsche Reagens zur Fällung von Aceton wird, wie folgt, hergestellt: 50 g Quecksilberoxyd werden in einer Mischung von 1 l Wasser und 200 ccm konz. Schwefelsäure gelöst (wenn erforderlich, auf dem Wasserbade).

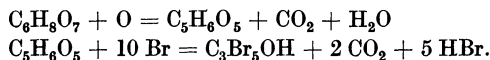
Ausführung. Die zu untersuchende Flüssigkeit (bei kleinen Mengen Citronensäure 50 ccm, bei größeren Mengen 100 ccm) wird in einem 200 ccm fassenden Destillierkolben mit Phosphorsäure (80%) stark angesäuert, z. B. bei etwa 0,1 g Citronensäure mit 5 ccm konz. Säure. Der Kolben wird mit einem doppelt durchbohrten dichten Kork- oder Gummistopfen verschlossen. Die eine Bohrung enthält einen massiven Glasstab, an dessen in die Flüssigkeit ragenden Ende ein etwa 1 cm langes Stück Glasrohr (0,2 cm Weite) angeschmolzen ist (Siedecapillare). Durch die andere Bohrung des Stopfens führt ein Glasrohr, das in eine Capillare ausgezogen ist, die 2—3 cm in den Kolbenhals ragt. Dieses Glasrohr ist mit einem höher stehenden Gefäß verbunden, das die 0,05%ige Kaliumpermanganatlösung enthält. Ein Schraubenquetschhahn dient als Verschluss und zur Regulierung des Zuflusses. Nachdem die Lösung zu lebhaftem Sieden erhitzt ist, wird der Quetschhahn in dem Maße geöffnet, daß 1—2 Tropfen in der Sekunde zu der Flüssigkeit in den Kolben fließen. Das Destillat wird mit möglichst kaltem Wasser in einem großen Schlangenkühler (wenigstens 40 cm lang) kondensiert und in einem ERLÉNMEYER- oder besser FRESÉNUS-Kolben aufgefangen. Die Destillation wird fortgesetzt, bis die zutropfende Kaliumpermanganatlösung nicht mehr reduziert wird bzw. Mangan-dioxydhydrat sich abscheidet. Das Destillieren soll etwas schneller vor sich gehen, als der Zufluß von Kaliumpermanganatlösung erfolgt, so daß die Flüssigkeitsmenge in dem Destillierkolben langsam abnimmt. Das Destillat wird in einem ERLÉNMEYER-Kolben bei einer geschätzten Menge von 0,05 g Citronensäure mit mindestens 10 ccm des obigen Reagens versetzt und dann am gleichen Schlangenkühler, der jetzt als Rückflußkühler wirkt, etwa  $\frac{3}{4}$  Stunden in gelindem Sieden erhalten, wobei mehrere Male die in den Rohrwindungen des Kühlers kondensierte Flüssigkeit mit Wasser in den Kolben zurückgespült wird. Schließlich wird der ausgeschiedene Niederschlag in einem GOOCH-Tiegel abfiltriert. Der im Tiegel gesammelte Niederschlag wird, wie dies unter  $\alpha\alpha$ ) beschrieben ist, mit Salpetersäure gelöst und die salpetersaure Lösung mit Ammoniumrhodanid titriert. 1 ccm verbrauchte 0,1 N.-Ammoniumrhodanidlösung entspricht 0,00296 g Citronensäure.

Die Methode gibt Werte, welche die zu bestimmende Citronensäuremenge auf 1% genau angeben; sie ist anwendbar für eine direkte Bestimmung von Citronensäure in Gemischen mit Stoffen, welche die direkte Anwendung der Methoden  $\alpha$  und  $\beta$  unmöglich machen. Die Gegenwart von Oxalsäure, Bernsteinsäure und Kohlenhydraten ist ohne Einfluß; die Beimengung von Weinsäure und Äpfelsäure veranlaßt sehr geringe Verschiebungen der Citronensäurewerte. Diese Einflüsse sind praktisch ohne Belang. Die Anwesenheit größerer Mengen von Proteinen und Fetten macht Vorversuche und Kontrollversuche notwendig bzw. eine Entfernung dieser Stoffe aus der Flüssigkeit. Bei Anwesenheit größerer Mengen von Kohlen-

<sup>1</sup> B. BLEYER u. J. SCHWAIBOLD: Milchw. Forsch. 1925, 2, 260. — Vgl. auch D. PRATT: Unit. States Dep. of Agricult. Circ. 1912, 88, 1 und J. J. WILLAMAN: Journ. Amer. Chem. Soc. 1916, 38, 2193.

hydraten ist eine Abscheidung der Citronensäure als Calciumcitrat von Vorteil, da die Kohlenhydrate von Permanganatlösung oxydiert werden, die Beendigung der Oxydation der Citronensäure nicht sichtbar wird und so zu große Destillatmengen erhalten werden.

d) **Bestimmung als Pentabromaceton.** Für diese Bestimmung, die auf der Reaktion von L. STAHR (S. 1116) beruht und bei der zunächst Acetondicarbonsäure und aus dieser Pentabromaceton nach den Gleichungen



gebildet wird, sind zwei Ausführungsformen, eine gewichtsanalytische und eine jodometrische vorgeschlagen worden:

$\alpha$ ) Gewichtsanalytische Bestimmung nach O. REICHARD<sup>1</sup>. 10 bis 100 ccm<sup>2</sup> der auf den Citronensäuregehalt zu untersuchenden Lösung werden in einer glasierten Porzellanschale auf dem Wasserbade bis auf rund 10 ccm eingedampft, in einen 50 ccm-Meßkolben gebracht, mit 10 ccm Schwefelsäure (1 + 1) und soviel ccm einer Lösung von 8,5 g Kaliumbromid und 2,5 g Kaliumbromat in 100 ccm Wasser versetzt, bis die Farbe der Untersuchungsflüssigkeit ein deutliches Orange ist; hierzu reichen 5—10 ccm aus. Das trübe Gemisch wird abgekühlt, bis zur Marke aufgefüllt, durchgemischt und durch wiederholtes Aufgießen auf ein Faltenfilter glanzhell filtriert.

20 ccm des Filtrates, die mit einer Pipette durch Ansaugen mittels Saugpumpe entnommen werden, werden in einem ERLLENMEYER-Kolben mit 2—5 ccm einer Kaliumbromidlösung (50%) im Überschuß versetzt, mit einem Tropfen einer gesättigten Eisenchloridlösung vermischt, auf 5° abgekühlt und mit gesättigter Kaliumpermanganatlösung aus einer Bürette unter fortwährendem Umschwenken tropfenweise versetzt solange, bis zunächst eine Dunkelbraunfärbung eintritt und einige Minuten bestehen bleibt. Hierzu sind je nach der Menge des Bromsalzes 8—10 ccm notwendig. Der mit einem Korkstopfen verschlossene Kolben bleibt unter Kühlung solange stehen, bis die dunkelbraune Farbe in Goldgelb aufgehellt ist (nach einigen Minuten). Dann wird abermals Permanganatlösung zugegeben, bis die Dunkelfärbung und nach einiger Zeit wieder die Aufhellung eingetreten ist, und die Oxydation solange fortgesetzt, bis eine Trübung, dann Abscheidung, gegebenenfalls Zusammenballung des Pentabromacetons und schließlich eine bleibende Mangandioxydabscheidung eingetreten sind. Gesamtverbrauch der Permanganatlösung rund 40 ccm. Das Mangandioxyd wird nach einstündigem Stehen mittels Kaliumbromidlösung (50%), bei größeren Mengen unter gleichzeitiger Zugabe von gesättigter, mit Schwefelsäure angesäuertem Ferroammoniumsulfatlösung gelöst und zum klaren Absitzen beiseite gestellt.

Das gebildete gelblichweiße, deutlich abgesetzte Pentabromaceton wird durch einen NEUBAUER-Platintiegel (gewogen) oder einen Glas- bzw. Porzellantiegel mit porösem Boden (nicht gewogen) filtriert, zweimal mit je 5 ccm kaltem Wasser ausgewaschen, kräftig abgesaugt und nach Abtrocknen der Außenseiten des Tiegels im Vakuum-Exsiccator über Schwefelsäure (nach 10 Minuten langem Evakuieren) 2 Stunden lang getrocknet und dann gewogen. Die Gewichtskonstanz wird durch eine zweite Wägung sichergestellt.

Die Menge Pentabromaceton wird bei NEUBAUER-Platintiegeln durch die Gewichtszunahme festgestellt, bei Glas- und Porzellanfiltriertiegeln durch die Gewichtsabnahme nach Entfernung des Pentabromacetons. Dieses wird mit

<sup>1</sup> O. REICHARD: Z. 1934, 68, 138. — Vgl. auch B. G. HARTMANN u. F. HILLIG: Journ. Assoc. official. agricult. Chemists 1927, 10, 264; C. 1927, II, 1985.

<sup>2</sup> Je nach der durch die Stärke der DENIGÈS-Reaktion (S. 1117) geschätzten Menge Citronensäure wählt man die Menge der in Untersuchung zu nehmenden Lösung: Bei mehr als 1 g/l 50 ccm und bei mehr als 2 g/l 10—20 ccm.

einigen ccm Äther, dann einigen ccm Alkohol und schließlich zweimal mit 10 ccm warmem Wasser behandelt, der Tiegel im Vakuum-Exsiccator getrocknet und gewogen. Gewichtsverlust = Pentabromaceton.  $\text{Pentabromaceton} \times 0,464 =$  kryst. Citronensäure.

$\beta\beta$ ) Jodometrische Bestimmung nach P. A. KOMETIANI<sup>1</sup>. Eine klare Citronensäurelösung mit einem Citronensäuregehalt von 5—40 mg wird in einen 100—200 ccm fassenden ERLÉNMEYER-Kolben gebracht, je 10 ccm der Flüssigkeit werden mit je 1 ccm Schwefelsäure (1:1) und 0,3 ccm Kaliumbromidlösung (22,5 g Kaliumbromid in 100 ccm Wasser) versetzt. Das Gesamtvolumen der zu untersuchenden Flüssigkeit darf nicht mehr als 100 ccm ausmachen. Die Mischung wird in ein vorher auf 40—50° erhitztes Wasserbad gestellt. Nachdem diese Temperatur erreicht ist<sup>2</sup>, wird die Citronensäure vorsichtig mit gesättigter Kaliumpermanganatlösung oxydiert; letztere wird tropfenweise unter Umschütteln so lange zugefügt, bis keine Entfärbung mehr eintritt. Ein Überschuß an Kaliumpermanganat ist zu vermeiden, da das entstehende Zwischenprodukt der Oxydation, die Acetondicarbonsäure, dann nicht bromiert, sondern weiter zu Kohlen-, Ameisen- und Oxalsäure oxydiert wird. Gleichzeitig mit der Citronensäure wird auch das Kaliumbromid durch das Permanganat oxydiert, und das freigewordene Brom bildet mit der Acetondicarbonsäure Pentabromaceton. Die Flüssigkeit wird zuerst gelb, dann braun von den ausgeschiedenen braunen Flocken des Mangandioxydhydrats. Man hält 5 Minuten lang auf dem Wasserbade; nach dem Erkalten wird eine mit Schwefelsäure angesäuerte gesättigte Ferrosulfatlösung zugesetzt, bis das freie Brom und das Mangandioxydhydrat gelöst sind. Wird das Pentabromaceton als Trübung abgeschieden, so läßt man die Flüssigkeit samt dem Niederschlag mindestens 1 Stunde lang stehen. Das Pentabromaceton wird durch ein kleines Filter abfiltriert und sorgfältig mit kaltem Wasser nachgewaschen.

Nach Absaugen der letzten Tropfen der Waschwässer wird das Pentabromaceton auf der Nutsche mit 25—50 ccm Alkohol (96—97%) aufgelöst und die Flüssigkeit in einem 400 ccm-Kolben gesammelt. Die alkoholische Pentabromacetonlösung wird mit 4—5 ccm Eisessig angesäuert und darauf wird die essigsäure Lösung auf einem bis zum Siedepunkt erhitzten, jedoch nicht siedenden Wasserbade erwärmt; dann werden 5 ccm einer alkoholischen 20%igen Natriumjodidlösung zugegeben, worauf die Flüssigkeit durch Jod gefärbt wird. Danach läßt man noch 3—5 Minuten auf dem Wasserbad stehen; nach 10—15 Minuten langem Erkalten wird die Flüssigkeit mit der 10—12fachen Menge Wasser verdünnt und je nach der Menge des freigewordenen Jods mit 0,1- oder 0,05 N.-Thiosulfatlösung und Stärkelösung als Indicator titriert. 1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung = 3,501 mg Citronensäure. Diese Methode eignet sich besonders gut für Massenbestimmungen.

$\gamma\gamma$ ) Mikrobestimmung als Pentabromaceton. Nach B. BLEYER und J. SCHWAIBOLD<sup>3</sup> verfährt man, wie folgt:

In die 10 ccm fassenden Schleudergläschen<sup>4</sup> (Abb. 7) wird die zu untersuchende Lösung — höchstens 6—8 ccm — mit etwa 2—10 mg Citronensäure gebracht, mit 4 Tropfen gesättigter Kaliumbromidlösung und 8 Tropfen Schwefelsäure (50%) versetzt; dann werden die Gläschen in ein Wasserbad von

<sup>1</sup> P. A. KOMETIANI: Zeitschr. analyt. Chem. 1931, 86, 359.

<sup>2</sup> Nach O. REICHARD (Z. 1934, 68, 138) empfiehlt sich die Oxydation bei 5°, weil bei 40—50° zu niedrige Ergebnisse erhalten werden.

<sup>3</sup> B. BLEYER u. J. SCHWAIBOLD: Milchw. Forsch. 1925, 2, 260. — Vgl. auch R. KUNZ: Arch. Chem. u. Mikroskopie 1914, 7 285.

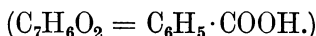
<sup>4</sup> Die zur Ausführung der Bestimmung erforderlichen Schleudergläschen für die Laboratoriumszentrifuge mit elektrischem Antrieb sind von der Firma F. u. M. Lautenschläger in München erhältlich.

45° gestellt. Nachdem der Inhalt der Gläschen die Temperatur des Wasserbades angenommen hat, wird tropfenweise unter Schütteln soviel gesättigte Kaliumpermanganatlösung zugegeben, bis eine dichte, braune Ausscheidung von Mangandioxydhydrat auftritt. Nach kurzem Zurückstellen der Gläschen in das Wasserbad läßt man rasch Ferrosulfatlösung (gesättigt, schwach schwefelsauer) hinzufließen, bis die Flüssigkeit gerade fast farblos geworden ist und läßt hierauf erkalten. Nach 20—30 Minuten langem Absitzenlassen des gebildeten Pentabromacetonniederschlages werden die Gläschen kurze Zeit geschleudert. Die an der Glaswand haftenden Teile des Niederschlages werden mittels eines kleinen Gummiwischers losgelöst und durch erneutes kurzes Schleudern mit dem Hauptanteil des Niederschlages in der Capillare vereinigt. Jetzt wird der Niederschlag mittels eines dünnen Glasstabes wiederholt zur Entfernung von Lufträumen und zur Herbeiführung einer gleichmäßigen Krystallgröße aufgelockert, worauf jedesmal wieder kurz geschleudert wird, bis das Volumen des Niederschlages auch bei 2 Minuten langem Schleudern konstant bleibt, was meist nach 3—5 maligem Ausschleudern und Auflockern der Fall ist.

Das ausgeschleuderte Pentabromaceton hat einen Schmelzpunkt von 73°; zur Kontrolle, ob der ausgeschleuderte Niederschlag auch rein ist, kann die Schmelzprobe in dem Schleudergläschen selbst ausgeführt werden (Einstellen in ein Wasserbad von 73°). Die Feststellung der Citronensäuremenge geschieht durch Ablesung der Teilstriche des capillaren Meßraumes, der mit bekannten Citronensäuremengen ein für alle Mal geeicht worden ist. Bei einer Tourenzahl von etwa 10000 Umdrehungen je Minute muß 2 Minuten geschleudert werden. Auch bei sehr kleinen Mengen (unterste Grenze 0,2 mg Citronensäure) können nach diesem Verfahren wenigstens 98% der tatsächlich vorhandenen Citronensäuremenge gefunden werden.

ε) **Sonstige Bestimmungsverfahren.** An sonstigen Bestimmungsverfahren sind noch folgende vorgeschlagen: Bestimmung als Cadmiumsalz von L. ROBIN (Ann. Chim. analyt. appl. 1904, 9, 453; C. 1905, I, 409), als Silbersalz von KAEMERER (Zeitschr. analyt. Chem. 1869, 8, 302) und G. ROMEO (Riv. Ital. Essenze Profumi 1929, 11, 23; C. 1930, I, 265), als Kohlenoxyd von M. SPICA (Chem.-Ztg. 1910, 34, 1141), durch Oxydation mit Cerisulfat von H. H. WILLARD und PH. YOUNG (Journ. Amer. Chem. Soc. 1930, 52, 132; C. 1930, I, 2775) und durch Oxydation mit Jodsäure von L. CUNY (Journ. Pharm. et Chim. 1926, [8] 3, 112; C. 1926, II, 2331).

## 10. Benzoessäure.



Die Benzoessäure ist geruchlos und krystallisiert in glänzenden Nadeln und Blättchen, die bei 121,7° schmelzen, und sublimiert in Nadeln und Tafeln bei 55—60°. Sie ist leicht löslich in Alkohol, Äther, Benzol, Essigester und heißem Wasser, dagegen nur wenig löslich in kaltem Wasser; 100 ccm Wasser von 0° lösen 0,156, von 17,5° 0,268, von 20° 0,290 g Benzoessäure. — Benzoessäure wird durch Ozon in alkalischer Lösung zu Kohlendioxyd oxydiert. Bei der Einwirkung von 1½ Mol Wasserstoffsperoxyd auf Ammoniumbenzoat entstehen ungefähr gleiche Mengen von o-, m- und p-Oxybenzoessäure. Von Permanganat wird Benzoessäure nicht angegriffen. Die Alkali- und Erdalkalisalze der Benzoessäure sind wasserlöslich, während die Schwermetallsalze nur wenig löslich sind. Bleiacetat erzeugt in Benzoatlösungen einen weißen Niederschlag von Bleibenzoat  $[Pb(C_7H_5O_2)_2 \cdot H_2O]$ , der im Überschusse von Bleiacetat löslich ist,

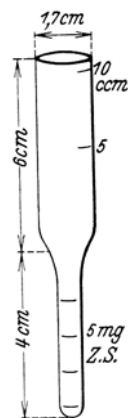


Abb. 7. Schleudergläschen zur Pentabromacetonbestimmung nach B. BLEYER und J. SCHWAIBOLD.

aber beim Kochen wieder ausgeschieden wird. — Silbernitrat erzeugt in Lösungen der freien Benzoesäure erst auf Zusatz von Natriumacetat einen weißen Niederschlag von Silberbenzoat ( $\text{AgC}_7\text{H}_5\text{O}_2$ ).

Über die Derivate der Benzoesäure siehe S. 1130.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an die Benzoesäure folgende Reinheitsanforderungen:

Wird 0,1 g Benzoesäure in 10 ccm Wasser durch Erwärmen gelöst, so darf das erkaltete Gemisch 0,1 ccm Kaliumpermanganatlösung nicht sofort entfärben (Zimtsäure). — In einem trockenen Probierrohr reibt man 0,1 g Benzoesäure und 0,5 g gelbes Quecksilberoxyd mit Hilfe eines Glasstabs gleichmäßig zusammen und erhitzt das Gemisch unter ständigem Drehen des Probierrohres über einer kleinen Flamme. Sobald die hierbei eintretende Gasentwicklung und die Glimmerscheinung vorüber ist, läßt man abkühlen, setzt 10 ccm verd. Salpetersäure hinzu, erwärmt bis nahe zum Sieden und filtriert. Das Filtrat darf durch Silbernitratlösung höchstens opalisierend getrübt werden (Chlorbenzoesäuren). — 0,2 g Benzoesäure dürfen beim Erhitzen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

### a) Nachweis.

Die Reaktionen zum Nachweise der Benzoesäure sind mit Ausnahme der beiden Geruchsreaktionen sämtlich Farbenreaktionen.

Man scheidet die Benzoesäure aus den zu untersuchenden Flüssigkeiten in der Regel durch Ausschüttelung mit Äther oder anderen Lösungsmitteln oder durch Destillation mit Wasserdampf oder aus festen Substanzen durch Sublimation ab.

*α*) **Reaktion nach E. MOHLER**<sup>1</sup>. Die Benzoesäure wird nitriert und die gebildete Dinitrobenzoesäure mit Hydroxylaminchlorhydrat zu Amidobenzoesäure reduziert. J. GROSSFELD<sup>2</sup> verfährt folgendermaßen: Die durch Äther- oder Petrolätherausschüttlung gewonnene Benzoesäure oder der alkalisch gewonnene Benzoatauszug wird in einem Reagensglas zur Trockene gebracht, dann mit 0,1 g Kaliumnitrat und 1 ccm konz. Schwefelsäure 20 Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt, abgekühlt und mit 2 ccm Wasser versetzt. Nach abermaligem Abkühlen wird mit 10 ccm etwa 15%iger Ammoniaklösung stark ammoniakalisch gemacht und mit 2 ccm Hydroxylaminchlorhydratlösung (2 g in 100 ccm Wasser) gemischt. Bei Gegenwart von Benzoesäure tritt alsdann je nach der vorhandenen Benzoesäuremenge langsamer oder schneller meist schon in der Kälte schwache Rotfärbung ein, die durch Eintauchen des Glases in heißes Wasser beschleunigt wird, während man die Intensität der Färbung durch darauffolgendes Eintauchen des Röhrchens in kaltes Wasser auf ihren höchsten Grad bringt.

TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>3</sup> geben zu der nitrierten, mit 2 ccm Wasser versetzten Lösung 5 ccm Äther, schütteln kräftig durch, trennen die Ätherlösung in einem kleinen Scheidetrichter ab, waschen sie mit 0,5 ccm Wasser, dampfen sie in einem Reagensglase auf dem Wasserbade ab, versetzen den Rückstand mit 0,25 ccm konz. Ammoniak, kühlen ab, setzen ein Kryställchen (etwa 0,05 g) Hydroxylaminchlorhydrat zu, erhitzen genau 5 Sekunden unter Umschütteln in einem siedenden Wasserbade, kühlen ab und verdünnen mit 0,75 ccm Wasser. Eine Rotfärbung zeigt noch 0,1—0,2 mg Benzoesäure an. Salicyl- und Zimtsäure stören die Reaktion.

*β*) **Eisenchloridreaktion**<sup>4</sup>. Bei der Ausführung der Reaktion ist darauf zu achten, daß sowohl die zu prüfende Lösung als auch die Ferrichloridlösung

<sup>1</sup> E. MOHLER: Bull. Soc. Chim. [3] **3**, 314; Zeitschr. analyt. Chem. 1897, **36**, 202.

<sup>2</sup> J. GROSSFELD: Z. 1915, **30**, 271. — Vgl. auch C. VON DER HEIDE u. F. JACOB: Z. 1910, **19**, 137 und H. RIFFART u. H. KELLER: Z. 1934, **68**, 122.

<sup>3</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, **23**, 111.

<sup>4</sup> W. v. GENERSICH: Z. 1908, **16**, 222. — K. FISCHER u. O. GRUENERT: Z. 1909, **17**, 721. — G. DENIGÈS: Bull. Soc. Pharm. Bordeaux **51**, 297; Zeitschr. analyt. Chem. 1913, **52**, 696.

möglichst neutral reagieren. Je nach der vorhandenen Benzoessäuremenge fällt auf Zusatz einer stark verd. Ferrichloridlösung ein milchiger bis flockiger Niederschlag von schmutzigweißer bis gelblich brauner Farbe<sup>1</sup> aus. Der gebildete Niederschlag ist im Überschuß von Ferrichlorid wieder löslich. Sehr verdünnte Lösungen färben sich daher nur gelblich, ohne daß ein Niederschlag entsteht.

Wird die Lösung nicht mit Lauge neutralisiert und mit Natriumacetat versetzt, sondern die Benzoessäure in ammoniakalischem Wasser gelöst und bis auf 1 ccm eingedampft, dann entsteht gleichfalls bei Anwendung von 1 mg Benzoessäure auf Zusatz von Eisenchlorid eine deutlich fleischfarbene Trübung, die sehr bald beim Stehen oder Erwärmen sich zu einem feinflockigen Niederschlag verdichtet. Handelt es sich um den Nachweis von Spuren Benzoessäure, so löst man in einem Tropfen Ammoniak und versetzt mit einem Tropfen verd. Ferrichloridlösung (1:1000). Es fällt ein gelblich-fleischroter Niederschlag von Ferribenzoat aus.

**γ) Reaktion nach A. JONESCU<sup>2</sup> in der Abänderung von C. VON DER HEIDE und F. JAKOB<sup>3</sup>.** Die freie Benzoessäure enthaltende Lösung wird auf je 1 mg Benzoessäure mit 3—5 Tropfen einer etwa 0,4%igen Lösung von Wasserstoffsperoxyd versetzt und im Wasserbade 5 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen setzt man 1—3 Tropfen einer 1%igen Ferrichloridlösung hinzu, worauf sofort oder nach kurzem Stehen die Violettfärbung der gebildeten Salicylsäure auftritt. Die gleiche Färbung tritt auch nach einiger Zeit allmählich auf, wenn man nicht im Wasserbade erhitzt.

Diese Reaktion steht an Empfindlichkeit und Deutlichkeit der MOHLERSchen Reaktion bei weitem nach, sie kann aber besonders wegen der Schnelligkeit ihrer Ausführung mit Vorteil zum Nachweis verwandt werden, wenn die Benzoessäure in größeren Mengen vorhanden ist.

Gleichfalls auf der Überführung in Salicylsäure beruht die Reaktion nach K. FISCHER und O. GRUENERT<sup>4</sup>. Die zu untersuchende Substanz wird in einigen Tropfen Natronlauge und etwa 1 ccm Wasser gelöst, in einen Silbertiegel gebracht, auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft und dann mit 2 g grob gepulvertem Ätzkali auf einer kleinen Flamme geschmolzen. Nach dem Schmelzen des Ätzkalis wird die Masse noch etwa 2 Minuten mit kleiner Flamme in Fluß gehalten — es empfiehlt sich während dieser Zeit mit einem starken Platindraht kräftig umzurühren —; dann wird die Schmelze in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgezogen. Man wäscht den Äther dreimal mit Wasser und verdunstet unter Zusatz von 1 ccm Wasser bei mäßiger Wärme und mit Hilfe eines Luftstromes. Der wäßrige Rückstand wird mit einigen Tropfen einer frisch bereiteten 0,05%igen Eisenchloridlösung auf Salicylsäure geprüft. 0,5 mg Benzoessäure lassen sich so nachweisen.

**δ) Nachweis nach M. Guerbet<sup>5</sup>.** Eine Spur Benzoessäure wird mit etwas rauchender Salpetersäure eingedampft und das Gemenge der Nitrobenzoensäuren mit 1 Tropfen 10%iger Zinnchlorürlösung erwärmt. Nach dem Erkalten diazotiert man mit 2 Tropfen einer 1%igen Natriumnitritlösung. Auf Zusatz einer 1%igen Lösung von Naphthol in 10%igem Ammoniak entsteht ein orangeroter Niederschlag von  $\beta$ -Naphtholazobenzoessäure, der sich in 1 ccm konz. Schwefelsäure mit rotvioletter Farbe löst; beim Eingießen in Wasser schlägt die Farbe in Gelborange um.

**ε) Nachweis nach J. C. HARRAL<sup>6</sup>.** Die Probe, die etwa 1—3 mg Benzoessäure enthält, wird mit 2 ccm einer Säuremischung von konz. Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure im Verhältnis 2:1 versetzt und während 5 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt. Darauf spült man in ein NESSLER-Glas über, so daß man etwa 20 ccm Flüssigkeit erhält. Zur Reduktion versetzt man die Flüssigkeit mit einem Stückchen Zink und läßt 10 Minuten in der Wärme einwirken. Nach Entfernung des Zinks setzt man 1 ccm einer 1%igen

<sup>1</sup> Der Niederschlag besteht nach R. F. WEINLAND und A. HERZ (Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1912, 45, 2662) im wesentlichen aus dem Monobenzoat einer Hexabenzooato-triferribase)

<sup>2</sup> A. JONESCU: Journ. Pharm. et Chim. 1909, [6] 29, 523; C. 1909, II, 312.

<sup>3</sup> C. VON DER HEIDE u. F. JAKOB: Z. 1910, 19, 137.

<sup>4</sup> K. FISCHER u. O. GRUENERT: Z. 1909, 17, 721.

<sup>5</sup> M. GUERBET: Compt. rend. Paris 1920, 171, 40; C. 1920, IV, 337.

<sup>6</sup> J. C. HARRAL: Analyst 1930, 55, 445.



Nitritlösung zu und nach 5 Minuten Ammoniak im Überschuß; darauf bringt man auf ein Volumen von 50 oder 100 ccm. Ist Benzoesäure vorhanden, so entsteht eine tiefgelbe Färbung.

γ) **Geruchsreaktionen.** α) Überführung in Benzaldehyd nach K. B. LEHMANN<sup>1</sup>. Man löst die Substanz in sehr wenig 0,1 N.-Kalilauge, säuert die Lösung auf einem Uhrglase mit verd. Schwefelsäure an, versetzt mit einigen Körnchen Natriumamalgam und bedeckt mit einem zweiten Uhrglase. Nach dem Aufhören der Wasserstoffentwicklung ist ein deutlicher Geruch nach Benzaldehyd wahrnehmbar, der auch nach einiger Zeit noch festgestellt werden kann.

G. BREUSTEDT<sup>2</sup> reduziert die Benzoesäure mit Ameisensäure.

β) Überführung in Benzoesäureäthylester nach A. RÖHRIG<sup>3</sup>. Man löst die Substanz in wenig absolutem Alkohol und verestert durch Kochen mit etwas konz. Schwefelsäure. Nach dem Erkalten wird Wasser hinzugefügt und der Benzoesäureäthylester mit Äther ausgeschüttelt. Um den Ester zu erkennen, taucht man einen Filtrierpapierstreifen in den Äther und läßt diesen verdunsten. Bei Gegenwart von Benzoesäure zeigt sich auch bei großer Verdünnung der charakteristische Geruch nach Benzoesäureäthylester.

η) **Mikrochemischer Nachweis.** Hierfür eignet sich in erster Linie die Mikrosublimation, wobei die Substanz auf einer vernickelten Messingplatte auf 60° erhitzt und das Sublimat auf einem auf etwa 25° gehaltenen Objektträger aufgefangen wird. Unter dem Mikroskop zeigt die Benzoesäure charakteristische wie Platten aussehende Prismen. Man löst das Sublimat in wenig Ammoniak und stellt die Eisenchloridreaktion an.

## b) Bestimmung.

α) **Bestimmung durch Sublimation nach E. POLENSKE<sup>4</sup>.** Man bringt die benzoesäurehaltige Substanz in ein Reagensglas von etwa 16 cm Länge und 1,5 cm lichter Weite und bedeckt die trockene Benzoesäure zuerst mit 2 g trockenem, gereinigtem Seesand. Darauf trennt man durch eine etwa 12—13 cm tief eingeschobene Scheibe Filtrierpapier von dem oberen, rein gebliebenen Teile des Reagensglases und sublimiert. Als Heizbad für die Sublimation verwendet man ein 7 cm hohes und 3,5 cm weites Wägegläschen, das 4 cm hoch mit Paraffinöl gefüllt ist. Die Öffnung des Glases bedeckt man mit einer Scheibe von Kartenpappe, in der sich zwei passende Öffnungen für das Reagensglas und das Thermometer befinden. Dieses Paraffinbad stellt man auf ein Drahtnetz mit Asbesteinlage. Dann wird das mit einem Uhrglas bedeckte Reagensglas senkrecht etwa 4 cm tief in das Paraffinöl eingehängt und durch 4 Stunden langes Erhitzen des Paraffinbades auf 180—190° die Sublimation der Benzoesäure bewerkstelligt. Nach Beendigung der Sublimation befindet sich das farblose, krystallinische Sublimat unmittelbar oberhalb der Pappscheibe an den Wandungen des Reagensglases. Das außen gesäuberte Reagensglas wird etwa 1 cm unterhalb des Sublimatansatzes abgesprengt; das Rohr wird vor und nach dem Lösen der Benzoesäure in neutralem Alkohol gewogen. Die alkoholische Lösung der Benzoesäure wird unter Verwendung von Phenolphthalein als Indicator mit 0,1 N.-Natronlauge titriert. 1 ccm der Lauge entspricht 0,0122 g Benzoesäure.

H. S. REED<sup>5</sup> sublimiert die Benzoesäure mittels eines der LIEBIGSchen Ente ähnlichen Gefäßes aus einem erhitzten Sandbade und saugt das Sublimat in N.-Natronlauge über. Diese wird mit verd. Schwefelsäure angesäuert, mit Chloroform extrahiert und die Benzoesäure in Calciumbenzoat übergeführt, das nach dem Glühen als Calciumoxyd titrimetrisch bestimmt wird.

β) **Colorimetrische Bestimmung nach J. GROSSFELD<sup>6</sup>.** Die nach der Reaktion nach MOHLER erhaltene Rotfärbung (S. 1126) kann zur colorimetrischen Bestimmung verwandt werden, da die Stärke der Reaktion leicht durch Vergleich mit der Färbung einer etwa 2%igen Kalium- oder Ammoniumrhodanidlösung mit einer Eisenlösung bestimmt werden kann. Vorteilhaft verwendet man eine

<sup>1</sup> K. B. LEHMANN: Chem.-Ztg. 1908, **32**, 949.

<sup>2</sup> G. BREUSTEDT: Arch. Pharm. 1899, **237**, 170.    <sup>3</sup> A. RÖHRIG: Z. 1908, **15**, 29.

<sup>4</sup> E. POLENSKE: Arb. Kais. Gesundh.-Amt **38**, 150; Zeitschr. analyt. Chem. 1913, **52**, 390.

<sup>5</sup> H. S. REED: Journ. Amer. Chem. Soc. 1907, **29**, 1626; Z. 1908, **16**, 311.

<sup>6</sup> J. GROSSFELD: Z. 1927, **53**, 467.

Eisenaunlösung von der 1 ccm = 0,1 mg Eisenoxyd entspricht; man löst 0,860 g Ammoniumeisenaun in 1 l Wasser und säuert mit wenig Salzsäure an.

Zum Vergleich gibt man in ein zweites Reagensglas von gleicher Form und Größe 1 ccm 25%ige Salzsäure und 13 ccm 2%ige Ammoniumrhodanidlösung. Dazu läßt man aus einer Bürette tropfenweise unter jedesmaligem Durchschütteln des Gemisches soviel der Eisenaunlösung tropfen, bis die Rotfärbungen in beiden Röhren, in der Längsrichtung betrachtet, übereinstimmen. Aus dem Verbräuche an Eisenlösung ergibt sich die ungefähre Benzoessäuremenge nach folgender Tafel:

| Eisenlösung<br>ccm | Benzoessäure<br>mg | Eisenlösung<br>ccm | Benzoessäure<br>mg | Eisenlösung<br>ccm | Benzoessäure<br>mg | Eisenlösung<br>ccm | Benzoessäure<br>mg |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 0,1                | 0,3                | 0,8                | 3,2                | 1,5                | 6,7                | 2,2                | 8,5                |
| 0,2                | 0,7                | 0,9                | 3,7                | 1,6                | 6,9                | 2,3                | 8,8                |
| 0,3                | 0,9                | 1,0                | 4,3                | 1,7                | 7,2                | 2,4                | 9,0                |
| 0,4                | 1,2                | 1,1                | 4,8                | 1,8                | 7,5                | 2,5                | 9,3                |
| 0,5                | 1,6                | 1,2                | 5,3                | 1,9                | 7,8                | 2,6                | 9,5                |
| 0,6                | 2,1                | 1,3                | 5,9                | 2,0                | 8,0                | 2,7                | 9,8                |
| 0,7                | 2,7                | 1,4                | 6,4                | 2,1                | 8,3                | 2,8                | 10,0               |

Zur möglichst genauen Bestimmung setzt man eine neue Bestimmung an und nimmt von der Benzoessäure soviel, als 1 mg nach der orientierenden Probe entspricht. In einem weiteren Reagensglas von gleicher Form bringt man 1 mg Benzoessäure in Form von 1,0 ccm einer Benzoatlösung (100 mg Benzoessäure in 10 ccm 0,1 N.-Natronlauge gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt) zur Trockne. Beide Reagensgläser werden gleichzeitig mit den gleichen Zusätzen wie oben (S. 1126) nitriert und mit Hydroxylamin reduziert. Die erhaltenen Färbungen werden dann im Colorimeter verglichen.

H. RIFFART und H. KELLER<sup>1</sup> haben die colorimetrische Bestimmung der Benzoessäure mit dem Stufenphotometer von ZEISS ausgeführt.

γ) Bestimmung nach J. R. NICHOLLS<sup>2</sup>. Das Verfahren beruht auf der teilweisen Oxydation zu Salicylsäure durch Wasserstoffsperoxyd in Gegenwart von Eisenchlorid in der Wärme. Bei Einhaltung der Versuchsbedingungen werden genau 10,5% der vorhandenen Benzoessäure zu Salicylsäure oxydiert. Ein aliquoter Teil der neutralen Lösung der Benzoessäure, der nicht mehr als 4 mg Benzoessäure enthalten darf, wird mit Wasser auf 15 ccm verdünnt. Nach dem Hinzufügen von 1 ccm Eisenchloridlösung (50 ccm N.-Eisenchloridlösung + 13 ccm N.-Schwefelsäure mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt) und 1 ccm 0,1%iger Wasserstoffsperoxydlösung (1 ccm eines 20%igen Wasserstoffsperoxyds wird auf 60 ccm verdünnt) wird eben zum Kochen erhitzt, 0,5 ccm N.-Natronlauge hinzugegeben, das Gemisch noch heiß in einen NESSLER-Zylinder filtriert, mit heißem Wasser ausgewaschen, das Filtrat abgekühlt und auf 50 ccm aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 Tropfen der Eisenchloridlösung wird der entstandene Farbton mit dem aus einer 0,01%igen Salicylsäure hergestellten Vergleichslösung verglichen.

Die Benzoessäurelösung darf keine merkbaren Mengen von fremden Salzen außer Nitraten enthalten, auch darf der Gehalt an Benzoessäure nicht mehr als 30 mg in 100 ccm betragen; im anderen Falle ist die Lösung entsprechend zu verdünnen.

δ) Die Verfahren von I. DE BREVANS<sup>3</sup> und E. REMY<sup>4</sup> sind nicht für Benzoessäure spezifisch.

<sup>1</sup> H. RIFFART u. H. KELLER: Z. 1934, 68, 122.

<sup>2</sup> J. R. NICHOLLS: Analyst 1928, 53, 19.

<sup>3</sup> I. DE BREVANS: Ann. Chim. analyt. appl. 1902, 7, 43; Z. 1902, 5, 685. — W. v. GENERSICH: Z. 1908, 16, 222.

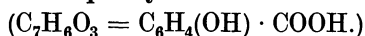
<sup>4</sup> E. REMY: Apoth.-Ztg. 1911, 26, 835. — Vgl. auch B. BRODSKY u. J. PERELMANN: Pharm. Zentralh. 1932, 73, 743.

ε) **Mikrobestimmung.** Sie erfolgt am besten durch Sublimation, die nach LIEUNGH<sup>1</sup> zweckmäßig zwischen zwei Uhrgläsern erfolgt.

## Derivate der Benzoesäure.

Von den Derivaten der Benzoesäure haben die Methyl-, Äthyl- und Propyl-ester der p-Oxybenzoesäure, die unter den Namen Nipagin, Nipasol, Nipacombin und Solbrol in den Handel kommen, ferner die p-Chlorbenzoesäure, als Mikrobin im Handel, neuerdings als Konservierungsmittel Bedeutung erlangt. Neben den einzelnen Estern gelangen auch deren Gemische mit ihren Natriumverbindungen zur Anwendung. So bestand z. B. eine Probe „Nipagin“ aus 28,3% freiem Ester, 45,8% der Natriumverbindung des Esters und 6,8% der Natriumverbindung der p-Oxybenzoesäure.

### 1. p-Oxybenzoesäure.



a) **Nachweis nach F. WEISS<sup>2</sup>.** Die p-Oxybenzoesäure (Schmp. 215<sup>0</sup>) gibt mit MILLONS Reagens<sup>3</sup> eine deutliche Rotfärbung, insbesondere beim Erwärmen. Die Reaktionen auf Benzoesäure nach GROSSFELD (S. 1126) und mit Eisenchlorid (S. 1126) treten nicht ein.

Mit Kupfersalzen liefert die Säure ein in Wasser und Alkohol schwer lösliches Salz. Zu seiner Darstellung wird die Säure in überschüssigem Ammoniak gelöst und die Lösung auf dem Wasserbade erwärmt, bis ein Geruch nach Ammoniak nicht mehr wahrnehmbar ist. Zu dieser Lösung gibt man eine kleine Menge von Kupfersulfat, das zuvor zu einem feinen Pulver zerrieben worden ist. Sofort entsteht eine Fällung von p-Oxybenzoesaurem Kupfer in Form von kleinen hellblauen Krystallnadeln. Man zerlegt das Salz mit verd. Schwefelsäure, äthert die Säure aus und bestimmt ihren Schmelzpunkt.

Salicylsäure gibt mit MILLONS Reagens eine braunrote Färbung. Wenn durch die Prüfung mit Eisenchloridlösung die Abwesenheit von Salicylsäure nachgewiesen ist, so ist die Reaktion mit MILLONS Reagens für p-Oxybenzoesäure beweisend. — Eine neutrale Ammoniumsalicylatlösung gibt mit Kupfersulfat keine Fällung, sondern eine grüne Lösung.

Nachweis der p-Oxybenzoesäure neben anderen Säuren. Außer durch das Kupfersalz kann die Trennung auch mit Tetrachlorkohlenstoff und durch Wasserdampfdestillation erfolgen. In Tetrachlorkohlenstoff ist die p-Oxybenzoesäure schwer löslich, während Benzoe-, Salicyl-, o- und p-Chlorbenzoesäure sowie Vanillin darin leicht löslich sind.

Nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>4</sup> ist p-Oxybenzoesäure in Petroläther vollkommen unlöslich; wenn daher die MILLONSche Reaktion im Ätherauszug eintritt, im Petrolätherauszug aber nicht, so liegt p-Oxybenzoesäure vor.

Durch Wasserdampfdestillation kann die p-Oxybenzoesäure von Benzoesäure und Salicylsäure getrennt werden. Der Destillationsrückstand wird mit Äther ausgeschüttelt und die p-Oxybenzoesäure durch den Schmelzpunkt identifiziert.

<sup>1</sup> LIEUNGH: Norges Apotfor. Tidskr. 1931, **39**, 164; Pharm. Zentralh. 1932, **73**, 663.

<sup>2</sup> F. WEISS: Z. 1930, **59**, 472.

<sup>3</sup> Nach TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE (Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, **23**, 111) wird die MILLONSche Reaktion, wie folgt, angestellt: Reagens: 1. Mercurisulfatlösung, hergestellt durch Erhitzen von 5 g Mercurioxyd mit 20 ccm konz. Schwefelsäure und 100 ccm Wasser bis zum beginnenden Sieden. 2. Natriumnitritlösung (2%). Ausführung der Reaktion: Die Substanz (z. B. der Petrolätherausschüttlungsrückstand) wird mit 1 ccm Mercurisulfatlösung genau 2 Minuten im Wasserbade erhitzt, abgekühlt und mit 1 Tropfen Natriumnitritlösung versetzt. Bei stärkeren Gehalten entsteht sofort, bei schwächeren nach einigen Minuten Rotfärbung, die nach 3—5 Minuten ihre größte Stärke erreicht; Vergleichen dürfen erst nach dieser Zeit erfolgen. Bei hohen Gehalten fällt eine rote Verbindung aus.

<sup>4</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, **23**, 111.

b) **Bestimmung.**  $\alpha$ ) Nach F. WEISS<sup>1</sup>. Sind in der zu untersuchenden, durch Ausschütteln mit Äther gewonnenen Lösung nur die Säure und Ester der Säure vorhanden, so wird der Rückstand verseift, die alkalische Lösung ausgeäthert und die Menge der p-Oxybenzoesäure durch Wägung ermittelt. Bei Gegenwart von Benzoe-, Salicyl-, o- und p-Chlorbenzoesäure behandelt man den Ausätherungsrückstand wie oben mit Tetrachlorkohlenstoff oder unterwirft ihn der Wasserdampfdestillation.

Etwa vorhandenes Vanillin muß dabei vorher durch Semioxamid (S. 1030) abgetrennt werden. Die Ergebnisse werden im allgemeinen zu niedrig ausfallen.

$\beta$ ) Als Tribromphenolbrom. p-Oxybenzoesäure kann in gleicher Weise wie Salicylsäure bestimmt werden; siehe S. 1138.

## 2. Ester der p-Oxybenzoesäure.

Methylester:  $C_8H_8O_3 = C_6H_4(OH) \cdot COO \cdot CH_3$ .

Äthylester:  $C_9H_{10}O_3 = C_6H_4(OH) \cdot COO \cdot C_2H_5$ .

Propylester:  $C_{10}H_{12}O_3 = C_6H_4(OH) \cdot COO \cdot C_3H_7$ .

Diese Ester sind leicht löslich in Alkohol, Äther — weniger in Petroläther —, Chloroform, ziemlich leicht in heißem und nur wenig in kaltem Wasser. Die wäßrigen Lösungen reagieren gegen Lackmus schwach sauer.

Schmelzpunkt des Methylesters 131°, des Äthylesters 116° und des Propylesters 96,2°.

Der Methylester ist im Wasserdampftrockenschranke beträchtlich flüchtig; von 0,1 g waren in 1 Stunde 45% flüchtig.

In den ebenfalls als Konservierungsmittel verwendeten Natriumverbindungen ist der Wasserstoff der Phenolgruppe durch Natrium ersetzt.

Für den Nachweis und die Bestimmung der Ester zieht man die Substanz in schwach schwefelsaurer Lösung mit einem Gemisch gleicher Teile Äther und Petroläther aus und läßt die Äther freiwillig oder bei einer Temperatur bis 40° verdunsten. Bei fettreichen Substanzen empfiehlt es sich, die Substanz der Wasserdampfdestillation zu unterwerfen und das Destillat nach der Filtration durch ein angefeuchtetes Filter mit Äther-Petroläther auszuziehen.

a) **Nachweis.**  $\alpha$ ) Nach F. WEISS<sup>2</sup>. Die Ester werden mit wäßriger Alkalilauge verseift und die dabei freiwerdende p-Oxybenzoesäure nach dem oben unter 1a angegebenen Verfahren nachgewiesen.

Zum Nachweise der bei der Verseifung frei werdenden Alkohole dienen folgende Verfahren:

$\alpha\alpha$ ) Methylester. Mindestens 1 mg der zu prüfenden Substanz wird mit Hilfe von einigen Tropfen Äther in ein Kölbchen gebracht und der Äther durch Erwärmen auf 40° verdunstet. Dann fügt man 5 ccm wäßrige Kalilauge (2%) und Siedesteinchen hinzu, schließt an einen kleinen LIEBIGSchen Kühler an, bringt die Flüssigkeit mit einer kleinen Flamme langsam zum Sieden und destilliert 3 ccm ab. Das Destillat prüft man nach DENIGÈS und v. FELLEBERG (S. 991) auf Methylalkohol.

$\beta\beta$ ) Äthyl- und Propylester. Zu dem Äther-Petrolätherauszug der Substanz gibt man in einem Kölbchen etwa 2 ccm wäßrige Kalilauge (10%) und etwa 4 ccm Wasser. Alsdann schließt man das Kölbchen mit Hilfe eines zweimal rechtwinklig gebogenen Rohres an einen kurzen, senkrecht stehenden Kühler an. Der an das Kölbchen angeschlossene Schenkel des Rohres ist zweckmäßig etwa 10 cm lang. Die alkalische Lösung wird 1 Stunde im schwachen Sieden erhalten, darauf werden etwa 4 ccm überdestilliert. Die Vorlage ist bereits bei Beginn des Erwärmens an den Kühler mit Hilfe eines doppelt durchbohrten Stopfens anzuschließen und mit Eiswasser zu kühlen. Durch die zweite Bohrung wird ein aufsteigendes Glasrohr geführt. 2 ccm des Destillates prüft man nach Zusatz von 4 bis 5 Tropfen Chromsäurelösung (50%) mit Hilfe der GRIEBELSchen Mikrobechermethode (S. 1026) auf bei der Oxydation entstandene Aldehyde. Aus dem Äthylester entstandener

<sup>1</sup> F. WEISS: Z. 1930, 59, 472.

<sup>2</sup> F. WEISS: Z. 1928, 55, 24 u. 1930, 59, 472.

Äthylalkohol würde hierbei Acetaldehyd liefern, der mit m- und p-Nitrophenylhydrazin charakteristische Hydrazonkrystalle bildet. Dagegen haben die Krystalle des Propylaldehyd-p-Nitrophenylhydrazons nicht so ausgeprägte Formen. Meist entstehen hier unregelmäßige Krystallnadeln, die häufig stumpfe Enden aufweisen. Eine Erkennung des Propylesters neben dem Äthylester dürfte daher nicht immer möglich sein. Dagegen ist der Äthylester neben dem Methyl- und Propylester sicher nachzuweisen, da Formaldehyd und Propylaldehyd im Gegensatz zum Acetaldehyd mit m-Nitrophenylhydrazin bei der Mikrodestillation keine Krystalle liefern.

β) Nachweis der Ester nach TH. SABALITSCHKA<sup>1</sup>. Der Nachweis erfolgt mit dem Reagens von E. NICKEL, das nach H. KREIS und J. STUDINGER<sup>2</sup> durch Lösen von 7 g Mercurichlorid und 4,4 g Kaliumnitrit in 100 ccm Wasser hergestellt wird; von dem in geringer Menge sich bildenden braunen Niederschlag wird abfiltriert. Dieses Reagens mischt man mit gleichen Teilen wäßriger Esterlösung oder man gibt 1 ccm zu dem trockenen Ester und erhitzt im Wasserbade 15 Minuten. Der Ester gibt sich durch allmählichen Eintritt einer Rotfärbung zu erkennen. Die Färbung tritt noch ein bei Anwendung einer 0,0015% Ester enthaltenden wäßrigen Lösung. Die Esterfärbung und die Vanillinfärbung mit NICKELs Reagens kann man unterscheiden durch ihr verschiedenes Verhalten gegenüber Äther. Schüttelt man bei der Esterfärbung die wäßrige Lösung mit Äther aus, so färbt sich dieser rotviolett, die wäßrige Lösung wird braungelb, bei öfterem Aufschütteln fast farblos. Beim Vanillin färbt sich der Äther blauviolett und die wäßrige Lösung kirschrot.

b) Bestimmung. α) Nach F. WEISS<sup>3</sup>. Die Bestimmung der Ester kann durch die Bestimmung der abgeschiedenen p-Oxybenzoesäure erbracht werden. Man verseift die Ester, säuert die alkalische Flüssigkeit an, schüttelt mit Äther-Petroläther aus und bringt den Rückstand zur Wägung. Die Menge der vorhandenen Ester kann man dann aus der gefundenen Menge p-Oxybenzoesäure unter Zugrundelegung der Molekulargewichte berechnen. Die Menge des Methyl-esters (Mol.-Gew. 152,07) findet man mit Hilfe des Faktors 1,1, während die entsprechenden Faktoren für den Äthylester (Mol.-Gew. 188,09) 1,2 und den Propylester (Mol.-Gew. 202,11) 1,3 betragen.

Der Methylester kann auch durch colorimetrische Bestimmung des beim Nachweis gebildeten Methylalkohols nach DENIGÈS und v. FELLEBERG (S. 996) bestimmt werden. Durch Multiplikation der gefundenen Menge Methylalkohol mit 4,75 kann die Menge des Esters errechnet werden. Außerdem kann der Methylester auch mit Hilfe der bekannten ZEISELSchen Methoxylbestimmung (S. 988) ermittelt werden. Gewogene Menge Silberjodid  $\times 0,648 =$  Methylester.

β) Nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>4</sup>. Man destilliert die Ätherausschüttlung der Substanz in einem 50 ccm-Stehkölbchen ab, setzt zum Rückstande 5 ccm Wasser und kocht kurz, um Reste von Äther und etwaigen anderen flüchtigen Stoffe sicher zu entfernen. Dann kühlt man ab, setzt 2 ccm Natronlauge (10%) hinzu, kocht 5 Minuten am Rückflußkühler und destilliert dann 4 ccm ab.

Chromsäureoxydation. 1 ccm Destillat wird in einem besonders gereinigten Reagensglase mit einer gemessenen überschüssigen Menge — in der Regel genügt 1 ccm — 0,2 N.-Kaliumbichromatlösung und 4 ccm reiner konz. Schwefelsäure versetzt und umgeschwenkt; sollte die Färbung der Flüssigkeit ausgesprochen grün sein, so ist sogleich noch etwas Bichromatlösung hinzuzusetzen. In gleicher Weise wird ein Leerversuch mit Bichromatlösung und Schwefelsäure angesetzt. Nach mindestens  $\frac{1}{4}$  Stunde gießt man die Lösungen in ERLÉNMEYER-Kölbchen und spült die Reagensgläser mit 80 ccm Brunnen-

<sup>1</sup> TH. SABALITSCHKA: Zeitschr. angew. Chem. 1929, 42, 936.

<sup>2</sup> H. KREIS u. J. STUDINGER: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1927, 18, 333.

<sup>3</sup> F. WEISS: Z. 1928, 55, 28 u. 1930, 59, 474.

<sup>4</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.

wasser nach. Die Lösung wird gut gekühlt, mit etwa 0,2 g Kaliumjodid versetzt und das ausgeschiedene Jod mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung titriert. Nach Abzug des Leerversuches erhält man den Chromsäureverbrauch für 1 ccm Destillat. 1 ccm 0,1 N.-Kaliumbichromatlösung entspricht 0,54 mg Methyl- oder 1,15 mg Äthyl- oder 0,60 mg Propylalkohol.

*Methylalkoholbestimmung.* Reagenzien: 1. Alkohol-Schwefelsäure. 10 ccm 95%iger Alkohol, in 60 ccm Wasser gelöst, werden mit 20 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und auf 100 ccm aufgefüllt. — 2. Fuchsin-schweflige Säure, bereitet durch Lösen von 0,5 g Fuchsin (MERCK) in 40 ccm siedendem Wasser, Verdünnen mit Wasser auf etwa 80 ccm, Zusetzen von 1,2 g Natriumsulfit, gelöst in etwa 6 ccm Wasser, Zusetzen von 10 ccm N.-Schwefelsäure und Auffüllen auf 100 ccm. Die Lösung wird nach einigen Stunden filtriert und im Dunklen aufbewahrt. — 3. Methylalkohollösung. 0,1 g in 100 ccm; 1 ccm = 1 mg Methylalkohol.

Ausführung: 1 ccm Destillat wird in einem Reagensglase mit 0,3 ccm Alkohol-Schwefelsäure und 0,3 ccm Kaliumpermanganatlösung (5 g in 100 ccm) versetzt, umgeschwenkt und genau 2 Minuten stehen gelassen. In gleicher Weise werden Typen von 0,05 und 1 mg Methylalkohol behandelt. Nach Ablauf der 2 Minuten setzt man je 0,3 ccm Oxal säurelösung (8 g in 100 ccm) zu, schwenkt um, fügt 0,3 ccm konz. Schwefelsäure und 1,6 ccm Fuchsin-schweflige Säure zu, schwenkt abermals um und läßt  $\frac{1}{2}$  Stunde stehen. Nun verdünnt man alle 3 Lösungen mit 5 ccm Wasser und vergleicht die Färbungen in einem Mikrocolorimeter. Die schwächsten Lösungen sind graugrün, die stärkeren blau und die stärksten violett.

Der Leerversuch ist zur Erkennung kleinster Mengen erforderlich, weil auch ohne Methylalkohol eine ganz leichte Färbung entsteht. Da die Färbungen den Gehalten nicht proportional sind, werden folgende Umrechnungen erforderlich:

Vergleich mit Typ 1 mg:

|                         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |     |     |      |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|
| Farbstärke:             | 0,1  | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,5  | 0,6  | 0,7  | 0,8  | 0,9  | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,35 |
| CH <sub>3</sub> -OH mg: | 0,15 | 0,29 | 0,42 | 0,55 | 0,67 | 0,77 | 0,83 | 0,89 | 0,95 | 1,0 | —   | —   | —   | —    |

Vergleich mit Typ 0,5 mg:

|                         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| CH <sub>3</sub> -OH mg: | 0,07 | 0,24 | 0,34 | 0,42 | 0,50 | 0,63 | 0,71 | 0,77 | 0,81 | 0,86 | 0,90 | 0,94 | 0,97 | 1,00 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|

Weichen die Färbungen von den Typlösungen stark ab, so empfiehlt es sich, die Bestimmung mit entsprechend verdünntem Destillat oder Typ zu wiederholen.

Methylalkohol  $\times$  5 = p-Oxybenzoesäure-Methylester.

*Propylalkoholbestimmung.* Reagenzien: 1. p-Oxybenzaldehydlösung. 0,2 g reiner p-Oxybenzaldehyd in 100 ccm reinstem 50%igem Alkohol. — 2. Propylalkohollösung. 0,25 ccm (= 0,2 g) Propylalkohol (MERCK) auf 100 ccm wäßriger Lösung. 0,5 ccm = 1 mg Propylalkohol.

Ausführung. Je 0,5 ccm Destillat, Propylalkohollösung und Wasser werden in Reagensgläsern mit je 0,25 ccm p-Oxybenzaldehydlösung versetzt und mit 1 ccm konz. Schwefelsäure unterschichtet. Man schwenkt um und stellt die Reagensgläser in ein siedendes Wasserbad. Nach 20 Minuten wird abgekühlt und die Färbungen werden im Mikrocolorimeter verglichen und danach der Gehalt berechnet. Der Vergleich mit dem Typ 1 mg ergibt:

|                                       |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|---------------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Farbstärke:                           | 0,2 | 0,25 | 0,3  | 0,35 | 0,4  | 0,5  | 0,6  | 0,7  | 0,8  | 0,9  | 1,0 |
| C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -OH mg: | 0   | 0,18 | 0,33 | 0,43 | 0,48 | 0,57 | 0,66 | 0,75 | 0,84 | 0,93 | 1,0 |

Die Gehalte sind den Farbstärken nicht ganz proportional und erst von 0,4 mg an genau. Es empfiehlt sich bei niedrigeren Gehalten die Vergleichslösung und bei höheren das Destillat derart zu verdünnen, daß möglichst gleiche Färbungen erhalten werden.

Propylalkohol  $\times$  3,33 = p-Oxybenzoesäure-Propylester.

*Äthylalkoholbestimmung.* Für die Äthylalkoholbestimmung fehlt eine genügend empfindliche kennzeichnende Reaktion. Die Gegenwart oder das Fehlen von Äthylester erkennt man aber in der Weise, daß der Methylalkohol- und Propylalkoholverbrauch vom Werte der Chromsäureoxydation in Abzug gebracht werden. Ein etwaiger Überschuß an oxydierbarer Substanz entspricht dem Gehalt an p-Oxybenzoesäure-Äthylester.

### 3. p-Chlorbenzoesäure.



Über die Löslichkeit der p-Chlorbenzoesäure (Mikrobinsäure) machen C. VON DER HEIDE und R. FÖLLEN<sup>1</sup> folgende Angaben: 100 g wäßrige Lösung

<sup>1</sup> C. VON DER HEIDE u. R. FÖLLEN: Z. 1927, 53, 487.

von 20° enthalten 0,071 g, 100 ccm absolut alkoholische Lösung von 20° 3,130 g. 100 g Wasser lösen bei 18° 38,46 g des Natriumsalzes.

Als Konservierungsmittel kommt die p-Chlorbenzoesäure und ihr Natriumsalz vorwiegend im Gemisch mit Benzoesäure und ihrem Natriumsalz in den Handel.

**a) Nachweis.**  $\alpha$ ) Nach F. WEISS<sup>1</sup>. 2—3 mg der durch Wasserdampfdestillation oder durch ein Ausschüttlungsverfahren abgetrennten sauren Substanz werden in einem Reagensglas mit 0,25 ccm konz. Schwefelsäure und einigen Kryställchen Kaliumnitrat 20 Minuten lang im siedenden Wasserbade erwärmt. Dann werden je 2 ccm Wasser und Ammoniakflüssigkeit unter Umschwenken hinzugefügt und etwa 1 ccm einer Lösung von 2 g Hydroxylaminhydrat in 100 ccm Wasser sorgfältig darübergeschichtet. Je nach der vorhandenen Menge Chlorbenzoesäure entsteht sofort oder innerhalb einiger Minuten eine mehr oder weniger kräftige grüne Farbzone. Die Reaktion tritt auch ein, jedoch langsamer, wenn die Hydroxylaminlösung über die abgekühlte Lösung geschichtet wird.

$\beta$ ) Nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>2</sup> führt man den Nachweis der Mikrobinsäure (Mischung von o- [Schmp. 140°] und p-Chlorbenzoesäure [Schmp. 243°]) durch ihren Chlorgehalt. Der Rückstand von der Petrolätherausschüttlung der Substanz wird in einer Platinschale mit 1 Tropfen gesättigter Kaliumcarbonatlösung und einem Kryställchen Kaliumnitrat vorsichtig eingedampft und kurze Zeit schwach geglüht, die Schmelze mit etwas Wasser aufgenommen, mit Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitratlösung auf Chlor geprüft. (Die Reagenzien müssen natürlich vorher auf Chlorfreiheit geprüft werden.)

**b) Bestimmung.**  $\alpha$ ) Nach C. VON DER HEIDE und R. FÖLLEN<sup>3</sup>. Die neutrale Lösung der p-Chlorbenzoesäure (bzw. des Mikrobins) wird in eine Platinschale übergeführt und auf dem Wasserbade eingengt, wobei man wiederholt kleine Mengen halogenfreien Natriumsuperoxyds hinzugibt, schließlich zur vollständigen Trockne verdampft und schwach glüht. Der Glührückstand, der durch Kohle schwarz gefärbt ist, wird mit Wasser aufgenommen, die Lösung von der Kohle abfiltriert und die Kohle sorgfältig ausgewaschen. Das Filtrat samt den Waschwässern wird, nötigenfalls nach dem Einengen, mit Silbernitrat versetzt und dann vorsichtig mit Salpetersäure angesäuert. Ein entstehender Niederschlag von Silberchlorid, das nach bekannten Verfahren zur Wägung gebracht wird, zeigt die Anwesenheit von p-Chlorbenzoesäure an. 1 g Silberchlorid entspricht 1,0918 g der Säure bzw. 1,2452 g des Natriumsalzes der Säure.

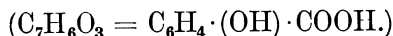
$\beta$ ) Nach F. WEISS<sup>1</sup> kann zur annähernd quantitativen Trennung der p-Chlorbenzoesäure von der Benzoesäure die Schwerlöslichkeit der p-Chlorbenzoesäure in Wasser (1 Tl. in etwa 5200 Tln. Wasser von 20°) verwertet werden, indem die Substanz mit Wasser behandelt oder mehrfach aus Wasser umkrystallisiert wird. Im allgemeinen wird jedoch der qualitative Nachweis der Säuren und die Bestimmung ihrer Gesamtmenge durch Wägung des gereinigten Ätherrückstandes ausreichen.

<sup>1</sup> F. WEISS: Z. 1934, 67, 84. — Nach F. WEISS ist der Nachweis der p-Chlorbenzoesäure nach der von C. VON DER HEIDE und R. FÖLLEN (Z. 1927, 53, 487) verwendeten verbesserten MOHLERSchen Reaktion, namentlich bei Gegenwart von Benzoesäure, nicht immer eindeutig.

<sup>2</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.

<sup>3</sup> C. VON DER HEIDE u. R. FÖLLEN: Z. 1927, 53, 487.

## 11. Salicylsäure.



Die Salicylsäure (o-Oxybenzoesäure<sup>1</sup>) krystallisiert aus Wasser in feinen Nadeln, die bei 155° schmelzen. Sie ist leicht löslich in Alkohol, Äther und Chloroform, Aceton und auch in siedendem Wasser (100 ccm lösen 8—8,5 g), dagegen schwer löslich in kaltem Wasser; 100 ccm Wasser von 0° lösen 0,09 g, von 15° 0,225 g. Salicylsäure ist mit Wasserdämpfen flüchtig; sie ist ferner bei 80—85° unzersetzt sublimierbar. — Chromsäure oxydiert Salicylsäure zu Ameisensäure und Kohlensäure; beim vorsichtigen Erwärmen mit Salpetersäure entstehen Pikrinsäure oder Nitrosalicylsäuren. Bei der Einwirkung von Brom auf die wäßrige Lösung entsteht unter Abspaltung von Kohlensäure Tribromphenolbrom. — Die Alkali- und die neutralen Erdalkalisalze sind in Wasser leicht löslich; schwer löslich sind die Salicylate von Blei, Kupfer, Zink und die basischen Erdalkalisalze.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an Salicylsäure folgende Reinheitsanforderungen:

Die Lösung von 1 g Salicylsäure in 5 ccm Schwefelsäure muß nahezu farblos sein (Fremde organische Stoffe). — 0,5 g Salicylsäure müssen sich in 10 ccm Natriumcarbonatlösung (1 + 9) klar lösen. Wird diese Lösung mit 10 ccm Äther ausgeschüttelt, die abgehobene Ätherschicht mit getrocknetem Natriumsulfat vom Wasser befreit und filtriert, so dürfen 5 ccm des Filtrats nach dem Verdunsten höchstens 0,001 g Rückstand hinterlassen, der geruchlos sein muß (Phenol). — Die weingeistige Lösung (1 + 9) darf nach Zusatz von wenig Salpetersäure durch einige Tropfen Silbernitratlösung nicht verändert werden (Salzsäure). Läßt man die weingeistige Lösung (1 + 9) verdunsten, so muß ein vollkommen weißer Rückstand hinterbleiben (Eisensalze, Phenol). — 0,2 g Salicylsäure dürfen nach dem Verbrennen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

### a) Nachweis.

Für den Nachweis und die Bestimmung der Salicylsäure scheidet man diese aus den zu untersuchenden Lösungen durch Extraktion mit Äther, Chloroform oder Petroläther oder durch Wasserdampfdestillation ab.

Von den zum Nachweis vorgeschlagenen Verfahren hat sich in der Praxis am besten die Eisenchloridreaktion bewährt, während die empfindlichste, aber für Salicylsäure nicht eindeutige Reaktion, die Rotfärbung mit MILLONs Reagens ist. Bei der Eisenchloridreaktion ist zu berücksichtigen, daß Maltol mit Eisenchlorid eine ähnliche Reaktion gibt. In Zweifelsfällen wird man zweckmäßig die Reaktion nach JORISSEN oder die noch einfachere Reaktion von E. BARRAL mit MANDELINs Reagens ausführen. Beide Reaktionen ermöglichen ebenfalls den Nachweis kleinster Mengen Salicylsäure in befriedigender Weise und treten mit Maltol nicht ein.

a) Reaktion mit Eisenchlorid<sup>2</sup>. Man setzt zu der neutralen, wäßrigen oder alkoholischen auf Salicylsäure zu prüfenden Lösung möglichst vorsichtig einige Tropfen einer Eisenchloridlösung, die man frisch durch Verdünnen einer Eisenchloridlösung (d = 1,28) im Verhältnis 1:600 herstellt. Bei Gegenwart von Salicylsäure entsteht Violettfärbung. Empfindlichkeit der Reaktion 1:100000. Durch Säuren und Alkalien wird die Empfindlichkeit der Reaktion herabgesetzt bzw. verhindert.

Nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>3</sup> werden einige ccm des Petrolätherauszuges der Substanz direkt oder nach dem Abdampfen mit 0,1 ccm Eisen-

<sup>1</sup> Über p-Oxybenzoesäure siehe S. 1130.

<sup>2</sup> Zu beachten ist, daß Maltol, welches sich in den Destillationsprodukten der Malzkaffee-Rösterei und auch in dem Malzkaffee selbst in geringer Menge (0,025—0,05 mg Salicylsäure entsprechend) findet, eine ähnliche Reaktion mit Eisenchlorid gibt wie Salicylsäure. — Vgl. J. BRAND: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, 27, 806; ferner TH. MERL: Z. 1926, 52, 321 u. 1928, 56, 472.

<sup>3</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.



chloridlösung (Eisenchloridlösung [0,5%] mit Zusatz von 0,5 ccm N.-Salzsäure auf 100 ccm) und 0,5—1 ccm Wasser geschüttelt. Eine Violettfärbung zeigt Salicylsäure an. Man kann auch die Substanz oder einen wäßrigen Auszug davon (mit 10% Alkoholzusatz) mit Petroläther oder nach BLAREZ<sup>1</sup> mit Benzol (ohne Alkoholzusatz) ausziehen und mit diesen Auszügen die Reaktion anstellen. Empfindlichkeit: 0,005—0,01 mg.

TH. MERL<sup>2</sup> führt die Reaktion capillaranalytisch aus. Man hängt in die ätherische Ausschüttlungslösung einen Filtrierpapierstreifen, der mit sehr verd. Eisenchloridlösung getränkt ist. Beim Vorhandensein von Salicylsäure in der Lösung bilden sich an dem herausragenden Papierstreifen alsbald Zonen von violetter Färbung, die rasch an Stärke zunimmt.

W. v. GENERSICH<sup>3</sup> läßt die beim Eindampfen der mit Phosphorsäure angesäuerten Lösung entweichenden Salicylsäuredämpfe auf einen mit verd. Eisenchloridlösung befeuchteten Filtrierpapierstreifen einwirken. Nach P. N. VAN ECK<sup>4</sup>, der in ähnlicher Weise eine mikrochemische Methode ausgearbeitet hat, geben nur die Dämpfe der freien Salicylsäure eine Violettfärbung mit Eisenchlorid, die der Salicylate dagegen nicht. Beim Erhitzen der Salicylate entsteht statt Salicylsäure Phenol, das in Dampfform auf Papier mit MILLONS Reagens Rotfärbung gibt.

Die Reaktion kann auch nach A. DESMOULIÈRES<sup>5</sup> zur Unterscheidung von Salicylsäure, Salicylsäureester und Hydrosalicylsäure, die sich sämtlich mit Eisenchlorid violett färben, dienen. Während die Eisenverbindung der Salicylsäure beim Schütteln mit Chloroform, Äther oder Petroläther beständig ist, werden die der Ester und der Hydrosalicylsäure zerstört und somit die Lösung entfärbt.

**β) Reaktion mit MILLONS Reagens.** Mit MILLONS Reagens (S. 605 und 1130, Anmerkung 3) gibt Salicylsäure eine Rotfärbung, die nach C. J. LINTNER<sup>6</sup> noch bei einer Verdünnung von 1:500000 auftritt. Es ist jedoch zu beachten, daß diese Reaktion nicht für Salicylsäure eindeutig ist.

**γ) Reaktion nach JORISSEN.** In der Abänderung von H. C. SHERMAN und A. GROSS<sup>7</sup> gibt man zu der zu untersuchenden Lösung je 5 Tropfen Kaliumnitritlösung (10%) und Essigsäure (50%), sowie einen Tropfen Kupfersulfatlösung (10%) und erwärmt  $\frac{3}{4}$  Stunden auf dem Wasserbade. Die entstandene Violettfärbung bleibt nach dem Erkalten beständig. In 5—8 ccm einer Lösung von 1:1000000 und 18—25 ccm einer solchen von 1:3500000 ist Salicylsäure noch nachweisbar.

**δ) Reaktionen nach E. BARRAL<sup>8</sup>.** α) Mit MANDELINS Reagens. TH. MERL und H. BEITTER<sup>9</sup> führen die Reaktion, wie folgt, aus: Man löst die zu prüfende Substanz bzw. den Verdampfungsrückstand der Ausschüttlung in 5—10 Tropfen Eisessig und setzt dann 2 Tropfen MANDELINS Reagens hinzu. Bei Gegenwart von Salicylsäurespuren erscheinen sofort dunkelblaue Streifen, die rasch einen grünen Farbton annehmen. MANDELINS Reagens ist eine Lösung von 0,5% Ammoniumvanadinat in 94—95%iger Schwefelsäure und ist, in braunen Flaschen aufbewahrt, von guter Haltbarkeit.

β) Mit Natriumnitrit und Schwefelsäure. Man bringt in ein Reagensglas 2 Tropfen der fraglichen Lösung und 2 ccm reine konz. Schwefelsäure, kühlt ab und läßt unter Schütteln 10%ige Natriumnitritlösung zutropfen. Die Flüssigkeit färbt sich nacheinander orangegelb, orangerot, blutrot und endlich johannisbeerrot.

<sup>1</sup> Vgl. J. L. CHELLE: Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 1925, **63**, 14; C. 1926, I, 2631.

<sup>2</sup> TH. MERL: Süddeutsch. Apoth.-Ztg. 1903, 624; Pharm. Zentralh. 1903, **44**, 896.

<sup>3</sup> W. v. GENERSICH: Z. 1908, **16**, 219.

<sup>4</sup> P. N. VAN ECK: Pharm. Weekbl. 1926, **63**, 913; C. 1926, II, 1307.

<sup>5</sup> A. DESMOULIÈRES: Ann. Chim. analyt. appl. 1903, **8**, 85; Z. 1904, **7**, 316.

<sup>6</sup> C. J. LINTNER: Zeitschr. angew. Chem. 1900, 707. Dort finden sich auch nähere Angaben über den Chemismus der Reaktion.

<sup>7</sup> H. C. SHERMAN u. A. GROSS: Journ. Ind. and Engin. Chem. 1911, **3**, 492; C. 1911, II, 1487. — Vgl. auch A. KLETT: Pharm. Zentralh. 1900, **41**, 452.

<sup>8</sup> E. BARRAL: Bull. Soc. chim. France 1912, [4] **11**, 41; C. 1912, I, 2073.

<sup>9</sup> TH. MERL u. H. BEITTER: Z. 1928, **56**, 472.

L. EKKERT<sup>1</sup> führt die Reaktion als Ringreaktion aus. Die nach dem Umschütteln rote Lösung wird beim Alkalisieren mit Natronlauge grasgrün.

Salicylsäuremethylester gibt die gleiche Reaktion, Salicylsäurephenylester (Salol) dagegen eine blaue, rote und violettschwarze Färbung; Sulfosalicylsäure gibt die Reaktion nicht.

ε) **Fällung durch Jod<sup>2</sup>.** Man fällt die Salicylsäurelösung mit 0,1 N.-Jodlösung unter Zusatz von etwas 0,1 N.-Natriumbicarbonatlösung, filtriert den Niederschlag (Schmp. 156°) ab und bestimmt den Schmelzpunkt. Empfindlichkeit 1:870000.

ζ) **Sonstige Reaktionen.** E. BARRAL gibt außer den obigen Reaktionen noch eine solche mit Ammoniumsulfat an, W. E. RIDENOUR<sup>3</sup> eine Reaktion mit Wasserstoffsperoxyd und Ammoniumcarbonat, ferner E. RIEGLER<sup>4</sup> eine Reaktion mit p-Diazonitranilin und G. DENIGÈS<sup>5</sup> eine solche mit Methylglyoxal, Kaliumbromid und Schwefelsäure.

η) **Mikrochemischer Nachweis.** Salicylsäure bildet bei der Sublimation dünne feine Nadeln, und dann aus diesen entstehende dicke Prismen. Auch die Reaktion mit Ferrichlorid (S. 1135) sowie die Silber- und Bleisalze finden Verwendung.

## b) Bestimmung.

Soweit nicht reine Lösungen der Salicylsäure zur Untersuchung vorliegen, muß man aus den Untersuchungsgegenständen zunächst die Säure mit Äther, Petroläther, Chloroform oder deren Gemischen ausziehen.

Für die Bestimmung der kleinen Mengen Salicylsäure, wie sie zu Konservierungszwecken angewandt werden, eignen sich in erster Linie die colorimetrischen Verfahren.

a) **Colorimetrische Bestimmung mit Eisenchlorid.** W. HEINTZ und R. LIMPRICH<sup>6</sup> haben folgendes Verfahren vorgeschlagen: 25 g (bzw. 50 g) der zu untersuchenden Lösung werden in einem Mischzylinder von 250 ccm Inhalt übergeführt und mit Wasser auf 50 ccm gebracht, und mit wenigen Tropfen konz. Schwefelsäure angesäuert. Darauf schüttelt man mit 100 ccm niedrig siedendem Petroläther kräftig durch, gibt 50 ccm Alkohol (96%) zu, schüttelt nochmals durch und läßt absitzen. 10 ccm der klaren Petrolätherschicht werden in EGGERTSchen Röhrchen mit 10 ccm der frisch bereiteten wäßrigen Eisenchloridlösung (0,1%) durchgeschüttelt und die entstandene Violettfärbung mit den Vergleichslösungen verglichen. Ist die Färbung zu stark, so wird ein entsprechend kleineres Volumen (5 ccm oder weniger) der Petrolätherschicht in der beschriebenen Weise mit der Eisenchloridlösung geschüttelt, ist sie zu schwach, so läßt sich die Reaktion dadurch verstärken, daß man nochmals 10 ccm oder mehr der Petrolätherschicht zugibt und durchschüttelt.

Die Vergleichslösungen werden in folgender Weise hergestellt: 50 ccm 0,1%ige Salicylsäurelösungen werden in genau gleicher Weise wie oben behandelt und von der Petrolätherschicht 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 ccm in EGGERTSchen Rörchen wie oben weiterbehandelt.

Berechnung des Salicylsäuregehaltes ( $x = g$  in 100 g bzw. 100 ccm):

$$x = \frac{5 \times \text{ccm Petrolätherlösung der Vergleichslösung}}{g \text{ (oder ccm) angewandte Substanz} \times \text{ccm Petrolätherlösung der Substanz}}$$

<sup>1</sup> L. EKKERT: Pharm. Zentralh. 1930, 71, 744.

<sup>2</sup> J. SCHMIDT in G. KLEIN's Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 2, 1, S. 486. Berlin: Julius Springer 1932.

<sup>3</sup> W. E. RIDENOUR: Amer. Journ. Pharmac. 1899, 71, 414; C. 1899, II, 848.

<sup>4</sup> E. RIEGLER: Pharm. Zentralh. 1900, 41, 563.

<sup>5</sup> G. DENIGÈS: Rép. de Pharm. 1911, Nr. 11; Pharm. Ztg. 1911, 56, 982.

<sup>6</sup> W. HEINTZ u. R. LIMPRICH: Z. 1913, 25, 706. — Vgl. auch W. FRESSENIUS u. L. GRÜN-HUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 292; nach ihnen soll die Lösung weniger als 2 mg Salicylsäure enthalten.

H. SERGER<sup>1</sup>, der das Verfahren nachgeprüft hat, empfiehlt zum Nachweise sehr geringer Mengen Salicylsäure von vornherein 2 ccm der Petrolätherschicht der Vergleichslösung und 30 ccm der Versuchslösung anzuwenden, weil sonst keine vergleichbaren Färbungen entstehen. Im übrigen bestätigt er die Brauchbarkeit des Verfahrens. Er beschreibt ferner ein Verfahren, bei dem die Bestimmung in Anlehnung an das Nachweisverfahren von E. SPAETH<sup>2</sup> erfolgt. Die Extraktion wird mit Petroläther-Chloroform (3 + 2 Vol.) vorgenommen und im übrigen ähnlich wie von HEINTZ und LIMPRICH verfahren. — Auf ein weiteres Verfahren von H. PELLET<sup>3</sup>, das wohl kaum praktisch brauchbar sein dürfte, sei verwiesen.

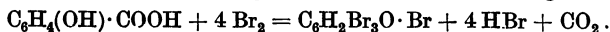
β) **Colorimetrische Bestimmung nach F. SCHOTT<sup>4</sup>.** Die Bestimmung beruht auf der Reaktion von JORISSEN (S. 1136). In gleich weite Röhren, die bei 5 ccm eine Marke haben, werden die zu untersuchende Lösung und als Typ-lösungen 0,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 9,0, 10 ccm einer 0,01%igen Salicylsäurelösung gefüllt. Hierzu werden 2 ccm einer 10fach verd. FEHLINGSCHEN Kupfersulfat-lösung und je 5 Tropfen 2%ige Kaliumnitritlösung und 10%ige Essigsäure gegeben und zur Marke aufgefüllt. Nach  $\frac{3}{4}$ stündigem Erhitzen im Wasserbade wird abgekühlt und verglichen. Ist die Färbung der zu untersuchenden Flüssigkeit sehr stark, so kann sie mit ungefähr gleichstark gefärbten Typen nach gleich starkem Verdünnen direkt oder in einem Colorimeter verglichen werden.

γ) **Bromometrische Bestimmung nach I. M. KOLTHOFF<sup>5</sup>.** Zu 25 ccm etwa 0,01 molarer Salicylsäurelösung fügt man in einem ERLÉNMEYER-Kolben mit Schliffstopfen 25 ccm 0,1 N.-Kaliumbromatlösung, 0,5—1 g Kaliumbromid und höchstens 5 ccm 4 N.-Salzsäure, wobei sich eine Ausscheidung von Tribromphenolbrom ( $C_6H_2Br_3OBr$ ) bildet. Nach 5—10 Minuten werden 5 ccm N.-Kaliumjodid-lösung zugegeben und nach 5 Minuten schließlich wird mit 0,1 N.-Thiosulfat-lösung der Jodüberschuß zurücktitriert. Erst gegen Schluß der Bestimmung nimmt man Stärke hinzu, schüttelt kräftig durch, damit auch alles adsorbierte Jod zurück in die Lösung gelangt. 1 ccm 0,1 N.-Kaliumbromatlösung entspricht 2,30 mg Salicylsäure.

Die Methode eignet sich auch zur Titration recht geringer Salicylsäuremengen, sofern man den richtigen Säuregrad von 5 ccm 4 N.-Salzsäure auf 50 ccm Flüssigkeit einhält. So konnten Einwaagen von 2—4 mg Salicylsäure noch auf 1% genau bestimmt werden.

L. ROSENTHALER<sup>6</sup> beschreibt ein auf der gleichen Abscheidung der Salicylsäure beruhendes titrimetrisches Verfahren, bei dem aber die Bestimmung durch Titration der bei der Reaktion gebildeten freien Bromwasserstoffsäure (vgl. die nachstehende Formel) beruht.

δ) **Bestimmung als Tribromphenolbrom nach W. AUTENRIETH und FR. BEUTTEL<sup>7</sup>.** Bei der Einwirkung von überschüssigem gesättigtem Bromwasser auf eine wäßrige Salicylsäurelösung entsteht ein rotbrauner Niederschlag von Tribromphenolbrom (Schmp. 133° unter Bromabgabe) nach der Gleichung:



Das Reaktionsgemisch läßt man unter häufigem kräftigem Umschütteln 1 bis 2 Stunden im Eisschrank oder bei Zimmertemperatur über Nacht stehen oder schüttelt 3 Stunden in der Schüttelmaschine. Der abfiltrierte Niederschlag wird über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Man findet auf diese Weise 97—99% der vorhandenen Salicylsäure.

<sup>1</sup> H. SERGER: Z. 1914, 27, 319.

<sup>2</sup> E. SPAETH: Süddeutsch. Apoth.-Ztg. 1906, Heft 1—3. — Vgl. H. SERGER: Z. 1914, 27, 319.

<sup>3</sup> H. PELLET: Ann. Chim. analyt. appl. 1901, 6, 364; Z. 1902, 5, 684.

<sup>4</sup> F. SCHOTT: Z. 1911, 22, 727.

<sup>5</sup> I. M. KOLTHOFF: Die Maßanalyse, Bd. 2, S. 454, 1928. — Vgl. ferner die Arbeiten von J. MESSINGER u. G. VORTMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1889, 22, 2312. — FR. FREYER: Chem.-Ztg. 1896, 20, 820. — W. FRESENIUS u. L. GRÜNHUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 292. — F. TELLE: Journ. Pharm. et Chim. 1901, [6] 13, 49; C. 1901, I, 422.

<sup>6</sup> L. ROSENTHALER: Pharmac. Acta Helv. 1931, 6, 209; C. 1932, I, 2358.

<sup>7</sup> W. AUTENRIETH u. FR. BEUTTEL: Arch. Pharm. 1910, 248, 112.

Phenol-, Salicylalkohol, Salicylaldehyd sowie p-Oxybenzoesäure geben die gleiche Reaktion und sind in gleicher Weise bestimmbar.

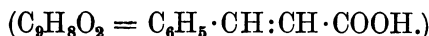
ε) **Bestimmung als Tetrajod-diphenylchinon nach J. BOUGAULT<sup>1</sup>.** 50 ccm der zu untersuchenden Lösung werden mit 1 g Natriumcarbonat (wasserfrei) und einem Überschuß von Jod in Kaliumjodid versetzt. Es bildet sich sofort ein rotvioletter Niederschlag von Tetrajod-diphenylchinon  $[(C_6H_2J_2O)_2]$ . Das Reaktionsgemisch wird  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade erwärmt und dann 10 Minuten am Rückflußkühler erhitzt. Den Jodüberschuß entfernt man durch Zusatz einiger Tropfen Natriumsulfitlösung, filtriert durch einen GOOCH-Tiegel mit Asbestfilter, wäscht aus und trocknet bei  $100^\circ$ . Niederschlag  $\times 0,4012 =$  Salicylsäure.

Phenol und p-Oxybenzoesäure werden in gleicher Weise gefällt.

ζ) **Verfahren nach E. Spaeth<sup>2</sup>.** Man zieht die Substanz bzw. schüttelt die Flüssigkeit mit einer Mischung von 3 Tln. leicht siedendem, frisch destilliertem Petroläther und 2 Tln. Chloroform aus, destilliert das Lösungsmittel in einem ERLÉNMEYER-Kolben ab, nimmt den Rückstand nochmals mit wenig Chloroform auf, filtriert durch ein kleines Filter in ein gewogenes Kölbchen, wäscht das Filter einige Male mit Chloroform aus, destilliert dieses ab, verjagt die letzten Reste davon durch Einblasen von Luft, erwärmt den Kolben mit Inhalt kurze Zeit auf dem Trockenschrank, trocknet 2 Stunden über Schwefelsäure und wägt.

Das Verfahren ist natürlich nur dann brauchbar, wenn in der Substanz keine anderen extrahierbaren Stoffe vorhanden sind. Eine Trocknung im Trockenschranke liefert unbrauchbare Ergebnisse, da Salicylsäure schon bei  $80-85^\circ$  sublimiert. Auch bei unvorsichtigem Abdestillieren der Lösungsmittel können Verluste entstehen.

## 12. Zimtsäure.



Die Zimtsäure (Trans-Zimtsäure,  $\beta$ -Phenylacrylsäure) ist in ihren Eigenschaften der Benzoesäure (S. 1125) sehr ähnlich; sie bildet monokline Säulen (aus Alkohol) vom Schmp.  $133^\circ$  und Siedepunkt  $300^\circ$ ; sie ist bei raschem Erhitzen unzersetzt sublimierbar und mit Wasserdämpfen flüchtig. Sie ist in Wasser ( $17^\circ$ ) schwer löslich (1:3500), dagegen in Alkohol und Äther leicht löslich. 1 Tl. Zimtsäure löst sich in 4,3 Tln. absol. Alkohol, 16,8 Tln. Chloroform ( $15^\circ$ ), in 109,6 Tln. Schwefelkohlenstoff ( $15^\circ$ ) und etwa 1000 Tln. kaltem Ligroin. — Das Calciumsalz löst sich in 608 Tln. Wasser ( $17,5^\circ$ ); die Silber-, Quecksilber- und Bleisalze sind schwer löslich. 100 ccm bei  $26^\circ$  gesättigte Lösungen enthalten<sup>3</sup> 0,242 g Calciumsalz, 0,256 g Mangansalz, 0,144 g Zinksalz, 0,07 g Cadmiumsalz und 0,028 g Mercurisalz. — Durch Oxydationsmittel wird die Zimtsäure zu Benzaldehyd und weiter zu Benzoesäure oxydiert.

### a) Nachweis.

Für den Nachweis schüttelt man die Zimtsäure aus ihren wäßrigen Lösungen mit Äther oder Petroläther aus.

α) **Reaktion nach W. L. SCOVILLE<sup>4</sup>.** Zimtsäure Salze liefern mit Mangansalzen eine zuerst weiße, dann bald gelb werdende Fällung (Unterschied von Benzoaten). Zum Nachweis sehr kleiner Mengen ist die Reaktion aber nach C. VON DER HEIDE und F. JACOB<sup>5</sup> wegen der immerhin nicht unbedeutlichen

<sup>1</sup> J. BOUGAULT: Compt. rend. Paris 1908, 146, 1403; Journ. Pharm. et Chim. 1908, [6] 28, 145; C. 1908, II, 543, 1129; Z. 1909, 18, 700.

<sup>2</sup> E. SPAETH: Z. 1901, 4, 924. — Vgl. auch W. FRESENIUS u. L. GRÜNHUT: Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 292.

<sup>3</sup> A. W. K. DE JONG: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1909, 28, 342; C. 1910, I, 479.

<sup>4</sup> W. L. SCOVILLE: Amer. Journ. Pharmac. 1908, 79, 549; C. 1908, I, 413.

<sup>5</sup> C. VON DER HEIDE u. F. JACOB: Z. 1910, 19, 137.

Löslichkeit des Salzes nicht sehr geeignet, da 100 ccm Wasser bei Zimmertemperatur 0,17 g Manganocinnamat lösen.

β) **Reaktion nach E. MOHLER.** Zimtsäure verhält sich wie Benzoesäure (S. 1126) mit dem Unterschiede, daß bei ihr die braunrote Färbung beim Kochen nicht verschwindet. Etwa 5—10 mg Zimtsäure in 100 ccm Wein sind noch nachweisbar.

γ) **Nachweis durch Überführung in Benzaldehyd<sup>1</sup>.** 50—100 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade auf etwa 10 ccm eingedampft. Der Rückstand wird alsdann mit 5—10 ccm Schwefelsäure (20%) angesäuert und im Scheidetrichter mit 20—40 ccm Äther ausgeschüttelt. Dem Ätherauszug entzieht man mit 1—5 ccm  $\frac{1}{3}$  N.-Lauge die Zimtsäure, erwärmt die wäßrige, schwach alkalische Lösung auf dem Wasserbade, um die letzten Reste gelösten Äthers zu vertreiben, läßt erkalten und versetzt in der Kälte mit etwa 1 ccm Kaliumpermanganatlösung (1%). Falls Zimtsäure zugegen ist, bemerkt man nach einigen Sekunden beim Umschwenken einen deutlichen Geruch nach Benzaldehyd. Auf diese Weise läßt sich 1 mg Zimtsäure in 100 ccm Flüssigkeit mit Sicherheit nachweisen. Mit 0,01 mg erhält man bei reiner Zimtsäure immer noch einen deutlichen Benzaldehydgeruch. Ist durch die Benzaldehydgeruchsprobe Zimtsäure nachgewiesen, so oxydiert man durch Zugabe von etwas größeren Permanganatmengen den Benzaldehyd in Wasserbadhitze zu Benzoesäure und weist diese nach MOHLER (S. 1126) nach.

TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>2</sup> lösen den Petrolätherrückstand in einem Reagensglase in 1 Tropfen N.-Natronlauge und 2—3 Tropfen Wasser, fügen in der Kälte 1 Tropfen Kaliumpermanganatlösung (5%) hinzu und säuern mit 1 Tropfen Schwefelsäure (1:4) an. Bei Anwesenheit von Zimtsäure entwickelt sich Benzaldehydgeruch, der sich bei kurzem Eintauchen in heißes Wasser verstärkt. Empfindlichkeit: 0,2 mg.

Die Oxydation zu Benzaldehyd kann auch durch andere Oxydationsmittel erfolgen, z. B. nach JORISSEN<sup>3</sup> durch Uransalze unter dem Einfluß des Sonnenlichtes, nach G. DENIGÈS<sup>4</sup> durch Kochen mit einigen Tropfen Eisenchloridlösung und Wasserstoffsuperoxyd und nach PHIPSON<sup>5</sup> mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat.

δ) **Nachweis nach D. SCHENK und H. BURMEISTER<sup>6</sup>.** Die Zimtsäurelösung wird mit Natriumcarbonatlösung alkalisch gemacht und in einer Porzellanschale mit ganz verd. Permanganatlösung tropfenweise unter Umrühren so lange versetzt, bis die Rötung nur noch eben verschwindet; dann äthert man gleich aus. Den Ätherauszug bringt man nach möglichster Befreiung von Wasser in einer Porzellanschale mit etwa 10 Tropfen ätherischer Phenollösung (5%) zum freiwilligen Verdunsten und versetzt dann mit 3—5 ccm konz. Schwefelsäure. Spuren von Zimtsäure geben hierbei sofort deutlich die typische quitten-gelbe Benzaldehydreaktion, auch dann, wenn ein Geruch nach Benzaldehyd nicht mehr erkennbar ist.

ε) **Mikrochemischer Nachweis nach O. TUNMANN<sup>7</sup>.** Zimtsäure läßt sich leicht durch Sublimation nachweisen. Bei der Identifizierung der Sublimate ist vor allem auf die Unterscheidung von Benzoesäure Rücksicht zu nehmen. Benzoesäurekrystalle erscheinen bei gekreuzten Nicols nur grau, und sind selten

<sup>1</sup> C. VON DER HEIDE u. F. JACOB: Z. 1910, 19, 137. — Vgl. auch H. ENELL: Pharm. Zentralh. 1904, 45, 405.

<sup>2</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.

<sup>3</sup> JORISSEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1902, 41, 630.

<sup>4</sup> G. DENIGÈS: Pharm. Weekbl. 1920, 57, 404.

<sup>5</sup> PHIPSON: Chem. News 63, 275; MEROX Reagenzien-Verz., 1929, S. 451. — Vgl. auch BÖTTCHER: Zeitschr. analyt. Chem. 1866, 5, 253.

<sup>6</sup> D. SCHENK u. H. BURMEISTER: Pharm. Ztg. 1915, 60, 213; Z. 1919, 38, 107.

<sup>7</sup> O. TUNMANN: Pharm. Zentralh. 1913, 54, 133.

gut ausgebildet. Zimtsäure und ihre Ester leuchten stark auf, besitzen schiefe Auslöschung und sind vorzüglich entwickelt. Benzoesäure verflüchtigt sich an der Luft in einigen Tagen. — Auf Zusatz von Silbernitrat löst sich Zimtsäure auf, während Benzoesäure lebhaft polarisierende Krystalle des Silbersalzes bildet. — Bromdämpfe verwandeln die Zimtsäure zunächst in braungelbe Tropfen; Benzoesäure bleibt farblos. Fügt man nach  $\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung etwas Schwefelkohlenstoff hinzu und läßt unter dem Deckglase liegen, so krystallisiert die Bromzimtsäure in büschelförmig angeordneten Blättchen.

### b) Bestimmung.

$\alpha$ ) Bestimmung durch Oxydation zu Benzoesäure<sup>1</sup>. Man gibt zu der neutralen Zimtsäurelösung mindestens das Doppelte der theoretisch erforderlichen Menge 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung und läßt die Mischung in einem verschlossenen Kolben bei Zimmertemperatur 15—20 Minuten stehen. Darauf säuert man mit Schwefelsäure an, gibt einen geringen Überschuß von Oxalsäure hinzu, schüttelt die gebildete Benzoesäure mit Äther aus und bestimmt die Benzoesäure nach S. 1128. 1 mg Benzoesäure entspricht 1,214 mg Zimtsäure.

$\beta$ ) Bestimmung durch Oxydation zu Kohlensäure und Wasser. Nach I. M. KOLTHOFF<sup>2</sup> gibt man zu 10 ccm einer etwa 0,1 N.-Zimtsäurelösung 25 ccm 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung und 10 ccm 4 N.-Natronlauge, läßt 24 Stunden in einem verschlossenen Kolben bei Zimmertemperatur stehen, säuert mit 25 ccm 4 N.-Schwefelsäure an und titriert den Permanganatüberschuß nach 2—3 Stunden mit 0,1 N.-Oxalsäure zurück. 1 ccm 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung entspricht 1,4793 mg Zimtsäure.

$\gamma$ ) Bestimmung durch Bromierung. Nach H. P. KAUFMANN und E. HANSEN-SCHMIDT<sup>3</sup> wird die Zimtsäure in Tetrachlorkohlenstoff gelöst — aus wäßrigen Lösungen ist sie vorher mit Äther oder Tetrachlorkohlenstoff auszuschütteln — und mit einem Überschuß von 0,1 N.-Bromlösung in Tetrachlorkohlenstoff 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, wobei die Zimtsäure in Dibromzimtsäure übergeführt wird. Dann wird der Bromüberschuß in bekannter Weise mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert. Durch Belichtung mit ultraviolettem Licht kann die Reaktionszeit auf 6—10 Minuten herabgesetzt werden. 1 ccm 0,1 N.-Bromlösung entspricht 7,40 mg Zimtsäure.

## 13. Sonstige Säuren.

In diesem Abschnitt ist der Nachweis und die Bestimmung einiger Säuren behandelt, die für die Praxis zwar von geringer Bedeutung sind, aber bei wissenschaftlichen Arbeiten gelegentlich in Betracht kommen.

### a) Propionsäure ( $C_3H_6O_2 = CH_3 \cdot CH_2 \cdot COOH$ ).

Spez. Gewicht (20°) 0,9916; Schmp. —22°; Siedepunkt 141°. Propionsäure mischt sich in jedem Verhältnis mit Wasser, wird aber durch Sättigung der Lösung mit Calciumchlorid wieder abgeschieden; sie ist mit Wasserdämpfen flüchtig.

$\alpha$ ) Nachweis. Im chemischen Verhalten und in ihren Salzen zeigt die Propionsäure die größte Ähnlichkeit mit Essigsäure. Die Salze der Propionsäure sind in Wasser löslich. Die Reaktionen mit Eisenchlorid und Arsen trioxyd sind denen der Essigsäure ähnlich. — Im Gegensatz zu Ameisensäure und Essigsäure sind die Eisen- und Kupfersalze der Propionsäure — auch die der Buttersäure — in Äther, Essigester und Chloroform löslich. — Zum mikrochemischen Nachweis sind die Barium- und Kupfersalze empfohlen. — Das Chininsalz ist in Wasser nur wenig löslich; Schmp. 111°.

<sup>1</sup> C. LIEBERMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1890, **23**, 153. — H. THOMS: Arch. Pharm. 1899, **237**, 271. — J. R. NICHOLS: Analyst 1928, **53**, 19.

<sup>2</sup> I. M. KOLTHOFF: Die Maßanalyse, Bd. 2, S. 328. Berlin: Julius Springer 1928.

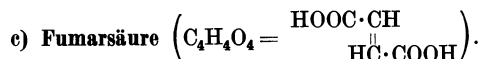
<sup>3</sup> H. P. KAUFMANN u. E. HANSEN-SCHMIDT: Arch. Pharm. 1925, **263**, 32.

β) **Bestimmung.** Nach J. B. McNAIR<sup>1</sup> kann Propionsäure neben Ameisen- und Essigsäure mit Kaliumpermanganat zu Oxalsäure oxydiert werden, die mit Calciumacetat gefällt wird.

FR. BAUM<sup>2</sup> hat ein auf der Oxydation der Propionsäure mit Chromsäure zu Essigsäure beruhendes Verfahren zur Bestimmung von Propionsäure in Essigsäure beschrieben.

#### b) Valeriansäuren (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>).

Von den 4 isomeren Valeriansäuren kommen n-Valeriansäure [CH<sub>3</sub> · (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> · COOH], Isovaleriansäure [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · CH · CH<sub>2</sub> · COOH] und Methyl-äthyl-essigsäure [CH<sub>3</sub> · C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> · CH · COOH] natürlich vor. Sie sind unangenehm riechende, in Wasser mäßig lösliche Flüssigkeiten, die sich in ihren Eigenschaften nur wenig unterscheiden. Spez. Gewichte (17,5/20°) 0,931—0,941; Siedepunkte (760 mm) 176—184°, Schmelzpunkte der Amide 112—129°. Die Eisen- und Kupfersalze zeigen die gleiche Löslichkeit wie die Propionsäuresalze. Zum Nachweis und zur Bestimmung dienen vorwiegend die Silbersalze, zum mikrochemischen Nachweis auch die Mercur-, Zink- und Kupfersalze.



Die Säure krystallisiert in kleinen weißen Nadeln oder Blättchen, die bei 200° sublimieren und den Schmelzpunkt (im geschlossenen Rohr bestimmt) 286—287° zeigen. Spez. Gewicht 1,625. 100 g Wasser von 16,5° lösen nur 0,672 g Fumarsäure. In alkoholischer Lösung geht sie durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht in die stereoisomere Maleinsäure über.

Dem Nachweis können dienen die Schmelzpunkte des p-Nitrobenzyl- (150,8°) und des Phenacyl- (204—205°) sowie die Krystallform der Säure und des Natriumuranilsalzes. — C. WAGENAAR<sup>3</sup> hat ein mikrochemisches Nachweisverfahren mittels Sublimation und Darstellung des Natriumuranilsalzes beschrieben.

Die der Fumarsäure stereoisomere **Maleinsäure**  $\left( \begin{array}{c} \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{COOH} \\ | \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{COOH} \end{array} \right)$  zeichnet sich vor jener durch einen niedrigeren Schmelzpunkt (130,5°) sowie durch eine größere Wasserlöslichkeit aus; sie ist in Wasser leicht löslich und auch in Alkohol und Äther löslich. Der sicherste Nachweis erfolgt durch Überführung in Fumarsäure durch Abdampfen mit verd. Salz- oder Salpetersäure oder auch durch Einwirken von Sonnenlicht auf die wäßrige Lösung bei Gegenwart von einer Spur Brom.

#### d) Malonsäure (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> = HOOC · CH<sub>2</sub> · COOH).

Malonsäure besteht aus in Wasser — 100 g Lösung enthalten bei 20° 73,5 g —, Alkohol und Äther leicht löslichen Blättchen oder Tafeln vom Schmp. 135,6°. Spez. Gewicht (25/4°) 1,618. Beim Erhitzen über ihren Schmelzpunkt zerfällt die Malonsäure in Essigsäure und Kohlensäure.

α) **Nachweis.** αα) Nach J. BOUGAULT<sup>4</sup>. Der Nachweis beruht auf der Kondensation der Malonsäure mit Zimtaldehyd zu Cinnamylmalonsäure. Man erhitzt etwa 0,1 g der Säure oder des Salzes mit 15 Tropfen Zimtaldehyd und 1 ccm Eisessig im geschlossenen Rohr 10 Stunden im siedenden Wasserbade, nimmt den Rohrinhalt unter Zusatz von Natriumcarbonat in 15 ccm Wasser auf, filtriert, säuert das Filtrat mit Salzsäure an, filtriert den Niederschlag ab und trocknet ihn bei 100°. Man krystallisiert aus Alkohol um und erhält goldgelbe Nadeln vom Schmp. 208°. Die Gegenwart organischer Säuren, wie Oxalsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure scheint die Reaktion nicht zu beeinträchtigen, ebenso wenig die Gegenwart von Alkalisalzen.

ββ) Nach S. KLEEMANN<sup>5</sup>. Erwärmt man Malonsäure mit Essigsäureanhydrid, so tritt in der Lösung eine gelbgrüne Fluoreszenz auf; 1 mg Malonsäure im Liter kann so noch nachgewiesen werden.

Zum mikrochemischen Nachweis sind das Bleimalonat und das Blei-Kupfermalonat besonders geeignet<sup>6</sup>.

β) **Bestimmung.** αα) Nach A. COUTELLE<sup>7</sup>. Man fällt die Malonsäure aus 60%igem Alkohol mit alkoholischer Bariumchloridlösung, trocknet den Niederschlag bei 100° und

<sup>1</sup> J. B. McNAIR: Journ. Amer. Chem. Soc. 1932, **54**, 3249; C. 1932, II, 2213.

<sup>2</sup> FR. BAUM: Chem.-Ztg. 1927, **51**, 517 u. 538.

<sup>3</sup> C. WAGENAAR: Chem. Weekbl. 1927, **64**, 6.

<sup>4</sup> J. BOUGAULT: Journ. Pharm. et Chim. 1913, [7], **8**, 289; C. 1913, II, 1705.

<sup>5</sup> S. KLEEMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1886, **19**, 2030.

<sup>6</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 353, 1922.

<sup>7</sup> A. COUTELLE: Journ. prakt. Chem. 1906, **73** (2), 49.

berechnet ihn als Bariummalonat mit  $\frac{5}{6}$  Mol Wasser. Durch Multiplikation mit 0,3329 erhält man die gesuchte Menge Malonsäure.

$\beta\beta$ ) Nach A. P. SY<sup>1</sup>. Man fällt aus neutraler Lösung mit neutraler Bleiacetatlösung, wäscht mit Wasser gut aus und führt das Bleimalonat durch Abrauchen mit Salpetersäure und Schwefelsäure in Bleisulfat über, das getrocknet und gewogen wird.

$\gamma\gamma$ ) Sonstige Verfahren. Oxydimetrisches Verfahren nach H. H. WILLARD und PH. YOUNG<sup>2</sup> mit Cerisulfat. Die Bestimmung ist aber nicht eindeutig für Malonsäure. — Verfahren nach G. DENIGÈS<sup>3</sup> mit Mercuriacetat und Eisessig.

### e) Glykolsäure ( $C_2H_4O_3 = CH_2(OH) \cdot COOH$ ).

Glykolsäure (Oxyessigsäure) kristallisiert aus Wasser in Nadeln, aus Äther in Blättchen, die bei 80° schmelzen; sie ist in Wasser, Alkohol und Äther sehr leicht löslich. Ihr Calcium- und Kupfersalz sind in Wasser schwer löslich. Beim Erhitzen werden Anhydride und außerdem wenig Paraformaldehyd gebildet. Mit Schwefelsäure erhitzt, wird die Glykolsäure in Formaldehyd und Ameisensäure gespalten. Durch Oxydation mit Salpetersäure entsteht Oxalsäure.

$\alpha$ ) Nachweis.  $\alpha\alpha$ ) Nach G. DENIGÈS<sup>4</sup> kann Glykolsäure durch Überführung in Formaldehyd und Nachweis des letzteren nachgewiesen werden. 2—10 mg der Säure werden mit 0,2 ccm Wasser und 2 ccm konz. Schwefelsäure über freier Flamme erhitzt, bis zahlreiche sehr feine Gasblasen auftreten. Man läßt erkalten, fügt 1 Tropfen 5%iger alkoholischer Kodeinlösung hinzu und schüttelt um. Es entsteht sofort eine gelbe Färbung, die schnell in ein starkes Violett übergeht. Bei Verwendung von Guajacol oder Parakresol statt Kodein sind 1 oder 2 Tropfen der alkoholischen Lösung und 1 ccm Eisessig zu dem obigen Gemisch von Glykol- und Schwefelsäure zuzufügen und dann erst ist über freier Flamme zu erhitzen. Mit Parakresol entsteht eine grüne oder grünbraune Färbung, die beim Verdünnen mit Alkohol, Essig- oder Schwefelsäure ein deutliches Grün zeigt. Guajacol färbt violett, beim Verdünnen mit Alkohol braun, mit Essig- oder Schwefelsäure violett.

$\beta\beta$ ) Nach E. EEGRIWE<sup>5</sup>. 1 Tropfen der zu prüfenden Lösung wird im Reagensglase mit 2—10 ccm einer Lösung von 0,01 g 2,7-Dioxynaphthalin in 100 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und 15—25 Minuten im Wasserbade erhitzt. Man erhält bei Gegenwart von 0,1—0,01 mg Glykolsäure und 2 ccm Reagens dunkelrotviolette bis violette Färbungen; 0,0002 mg geben nach 15 Minuten noch eine hellrote Färbung. — Ameisensäure, Essigsäure, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Benzoesäure und Salicylsäure geben keine Farb-reaktion. Milchsäure und Äpfelsäure geben Gelbfärbung und grüne Fluorescenz, Weinsäure olivengrüne bis dunkelgrünlichbraune Färbung.

$\gamma\gamma$ ) Nach P. MAYER<sup>6</sup> kann der Nachweis auch mittels des Phenylhydrazids erfolgen. — Zum mikrochemischen Nachweis sind die Salze des Silbers, Kupfers und Calciums empfohlen.

$\beta$ ) Bestimmung. Diese kann nach H. H. WILLARD und PH. YOUNG<sup>7</sup> durch Oxydation mit Cerisulfat erfolgen; die Bestimmung ist aber nicht eindeutig für Glykolsäure.

### f) Glyoxalsäure ( $CHO \cdot COOH$ ).

Die Glyoxalsäure (Glyoxylsäure) ist ein schwer kristallisierender Sirup; sie ist leicht löslich in Wasser und Alkohol und aus konz. Lösung etwas flüchtig. Beim Kochen mit Kalilauge und Kalkwasser geht sie in Glykolsäure und Oxalsäure über. — Als Aldehydsäure gibt sie die Reaktionen der Aldehyde: Sie reduziert neutrale Silberlösung schon bei gelindem Erwärmen und bildet mit essigsäurem Phenylhydrazin ein Phenylhydrazon vom Schmp. 143—145°. Das neutrale und basische Calciumsalz ist schwer löslich.

$\alpha$ ) Nachweis.  $\alpha\alpha$ ) Nach O. DOEBNER und S. GÄRTNER<sup>8</sup>. Durch Einwirkung von je 1 Mol Glyoxalsäure und Amidoguanidinacetat in wäßriger Lösung entsteht bei gewöhnlicher Temperatur oder beim Erwärmen Amidoguanidin-glyoxalsäure. Schmp. 161° (Zersetzung). Die Säure scheidet sich selbst aus sehr verdünnten Lösungen ab und gestattet den Nachweis der Glyoxalsäure neben anderen Säuren.

<sup>1</sup> A. P. SY: Journ. Franklin Inst. 1906, **162**, 71; C. 1906, II, 714.

<sup>2</sup> H. H. WILLARD u. PH. YOUNG: Journ. Amer. Chem. Soc. 1930, **52**, 132; C. 1930, I, 2775.

<sup>3</sup> G. DENIGÈS: Ann. Chim. analyt. appl. 1918, **23**, 27.

<sup>4</sup> G. DENIGÈS: Bull. Soc. Pharmac. Bordeaux 1909, **49**, 193; Z. 1910, **20**, 722.

<sup>5</sup> E. EEGRIWE: Zeitschr. analyt. Chem. 1932, **89**, 124.

<sup>6</sup> P. MAYER: Zeitschr. physiol. Chem. 1903, **38**, 135.

<sup>7</sup> H. WILLARD u. PH. YOUNG: Journ. Amer. Chem. Soc. 1930, **52**, 132.

<sup>8</sup> O. DOEBNER u. S. GÄRTNER: Liebigs Ann. 1901, **315**, 1 u. **317**, 157; C. 1901, I, 682 u. II, 627.



$\beta\beta$ ) Nach E. BAUR<sup>1</sup>. Glyoxalsäure gibt die TOLLENSche Reaktion mit Naphthoresorcin. Man versetzt 1—2 ccm mit einer Messerspitze Naphthoresorcin und etwa 5 ccm rauchender Salzsäure, erhitzt zum Sieden, verdünnt nach dem Erkalten mit etwas Wasser und schüttelt mit Äther aus, welcher bei Anwesenheit von Glyoxalsäure einen violetten bis tiefroten Farbstoff aufnimmt. Die Reaktion ist sehr empfindlich und noch bei weniger als 0,001 N.-Lösungen positiv, aber nicht eindeutig, da sie eine allgemeine Reaktion auf Carbonylsäure mit der Gruppierung COH·COOH und CO·COOH ist.

$\gamma\gamma$ ) Für den mikrochemischen Nachweis<sup>2</sup> sind das Silber-, Blei- und Calciumsalz sowie die Reaktion mit Dimethion empfohlen worden.

$\beta$ ) **Bestimmung.** Man oxydiert die wäßrige Lösung der Glyoxalsäure mit verd. Salpetersäure oder Bromwasser zu Oxalsäure und bestimmt diese.

### g) Brenztraubensäure ( $C_3H_4O_3 = CH_3 \cdot CO \cdot COOH$ ).

Brenztraubensäure ist eine nach Essigsäure riechende Flüssigkeit. Mit Wasser, Alkohol und Äther ist sie in jedem Verhältnis mischbar und siedet unzersetzt bei 165—170°. Mit Wasserdampf ist sie etwas flüchtig. Schmp. 13,6°, Spez. Gewicht (25°) 1,2469. — Mit ammoniakalischer Silberlösung liefert sie einen Silberspiegel.

$\alpha$ ) **Nachweis.**  $\alpha\alpha$ ) Nach L. J. SIMON und L. PIAUX<sup>3</sup>. Zu 1 ccm der zu untersuchenden Lösung setzt man 0,5 ccm Essigsäure (40%), 3 ccm Nitroprussidnatriumlösung (1%) und 1,5 ccm Ammoniak (0,75 ccm Ammoniak 22° Bé und 0,75 ccm Wasser). Bei Gegenwart von Brenztraubensäure entsteht nach einigen Minuten eine blaue Färbung. Diese Färbung kann auch zur colorimetrischen Bestimmung verwandt werden. Nur Acetophenon gibt eine ähnliche Färbung.

$\beta\beta$ ) Nach E. P. ALVAREZ<sup>4</sup>. Als Reagens verwendet man eine Lösung von 0,02—0,05 g  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Naphthol in 1 ccm Schwefelsäure (1,83). — 10 Tropfen des Reagens werden mit 1 Tropfen Brenztraubensäurelösung gelinde erwärmt. Bei Anwesenheit von Brenztraubensäure liefert  $\beta$ -Naphthol eine rote und dann blaue Färbung, die bei starker Verdünnung mit starkem Alkohol oder Wasser in Gelb übergeht.  $\alpha$ -Naphthol gibt in der Kälte eine gelbe, beim Erwärmen eine orangefarbene Lösung, die beim Verdünnen mit Wasser nicht verändert wird. Mittels dieser Reaktion kann man Brenztraubensäure neben Äpfel-, Wein- und Citronensäure usw. nachweisen.

Mikrochemischer Nachweis<sup>5</sup>. Das Chlorhydrat von Phenylhydrazin bewirkt sogleich eine pulverige Fällung. Noch stärker fällt das Chlorhydrat von Diphenylhydrazin.

$\beta$ ) **Bestimmung.**  $\alpha\alpha$ ) Nach I. SMEDLEY MACLEAN<sup>6</sup>. Man fällt die Säure in essigsaurer Lösung mit Phenylhydrazin, filtriert vom gebildeten Hydraton ab und oxydiert das Filtrat bei Zimmertemperatur mit FEHLINGScher Lösung. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wird abfiltriert, in Ferrisulfatlösung gelöst und das gebildete Ferrosulfat mit 0,1 N.-Permanganat titriert. Die Gegenwart von Glucose ist ohne störenden Einfluß.

$\beta\beta$ ) Nach E. SIMON und C. NEUBERG<sup>7</sup>. Als Fällungsmittel wird 2,4-Di-nitro-phenylhydrazin benutzt. Die Fällung ist praktisch quantitativ, sowohl bei 1 wie bei 0,1%igen Lösungen. Die Menge des Di-nitro-phenylhydrazins wird so bemessen, daß ein Überschuß von etwa 10% über die erforderliche Menge vorhanden ist. Man läßt die Suspension in einem ERLÉNMEYER-Kolben mit Glasstopfen 10 Stunden im Brutschrank bei 37° stehen. Nach Abkühlung saugt man auf einem SCHOTTschen Glasfiltertiegel (Nr. 1, G. 4) ab, wäscht dreimal mit kalter 2 N.-Salzsäure und darauf ebenso oft mit kaltem Wasser aus, trocknet bei 110° und wägt. Die Reinheit der erhaltenen Verbindung kann man durch den Schmelzpunkt (216°) und durch folgende Farbreaktion kontrollieren: Mit alkoholischer Kalilauge färbt sich die Verbindung braunrot. Das Verfahren eignet sich auch zur Trennung der Brenztraubensäure von Acetaldehyd und Methylglyoxal, da deren Hydrazone in Natriumcarbonat unlöslich sind.

$\gamma\gamma$ ) Nach B. H. RAO KRISHNA und M. SREENIVASAYA<sup>8</sup>. Der Bestimmung liegt die Reaktion:  $CH_3 \cdot CO \cdot COOH + 2H \rightarrow$  Milchsäure + O  $\rightarrow$   $CH_3 \cdot CHO + CO_2 + H_2O$  zugrunde.

<sup>1</sup> E. BAUR: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1913, 46, 852. — Vgl. ferner J. A. MANDEL u. C. NEUBERG: Biochem. Zeitschr. 1908, 13, 148 und C. NEUBERG: Biochem. Zeitschr. 1910, 24, 436.

<sup>2</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 355, 1922. — EMICH: Mikrochemie 1926, 217.

<sup>3</sup> L. J. SIMON u. L. PIAUX: Bull. Soc. Chim. biol. 1924, 6, 477; C. 1924, II, 1490.

<sup>4</sup> E. P. ALVAREZ: Chem. News 91, 209; Zeitschr. analyt. Chem. 1910, 49, 53.

<sup>5</sup> BEHRENS-KLEY: Organisch-mikrochemische Analyse, S. 105, 1922.

<sup>6</sup> I. SMEDLEY MACLEAN: Biochem. Journ. 1913, 7, 611; C. 1914, I, 1305.

<sup>7</sup> E. SIMON u. C. NEUBERG: Biochem. Zeitschr. 1931, 232, 479.

<sup>8</sup> B. H. RAO KRISHNA u. M. SREENIVASAYA: Biochem. Journ. 1928, 22, 72; C. 1930, II, 1891.

Man versetzt 1—5 ccm der Brenztraubensäurelösung (etwa 0,25—15 mg enthaltend) mit 50 ccm Schwefelsäure (17,5%), 1 g Zink und 1 ccm Kupfersulfatlösung (10%). Nach 1 Stunde neutralisiert man tropfenweise mit Natronlauge (60%). Nach Zusatz von 10 ccm N.-Schwefelsäure und 0,1 N.-Mangansulfatlösung wird mit 0,01 oder 0,005 N.-Kaliumpermanganatlösung oxydiert und der gebundene Aldehyd wird nach CLAUSEN titriert. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung entspricht 5,5 mg Brenztraubensäure.

δδ) Mikroverfahren nach O. WARBURG, F. KUBOWITZ und W. CHRISTIAN<sup>1</sup>. Das Verfahren beruht auf der Zersetzung der Brenztraubensäure mit LEBEDEV-Saft. Es entwickelt sich Kohlensäure durch die Wirkung der NEUBERGSchen Carboxylase, die manometrisch gemessen werden kann. Das Verfahren eignet sich besonders zur Bestimmung der Brenztraubensäure in biologischem Material.

#### h) Lävulinsäure ( $C_6H_8O_3 = CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$ ).

Lävulinsäure ( $\beta$ -Acetylpropionsäure) entsteht aus Kohlenhydraten durch Einwirkung von Säuren und bildet Blättchen und Tafeln vom Schmp. 33,5°. Die reine Säure destilliert bei raschem Erhitzen größtenteils unzersetzt bei 245—246°. Spez. Gewicht (15/15°) = 1,135, bei 25° 1,1367. Lävulinsäure ist leicht löslich in Wasser, Alkohol und Äther und geht beim Sieden leicht in Anhydride über. Bei der Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure entstehen Kohlensäure und Essigsäure. Beim Erhitzen mit verd. Essigsäure entstehen Kohlendioxyd, Essigsäure, Bernsteinsäure und Oxalsäure, wahrscheinlich auch Ameisensäure. Aus der mit Ammoniak neutralisierten Lösung wird durch Silbernitrat das Silbersalz gefällt, das in 150 Tln. Wasser von 17° löslich ist. Auf Zusatz einer Lösung von Phenylhydrazin in gleichen Teilen 50%iger Essigsäure fällt das Phenylhydrazon (Schmp. 108°) aus.

Lävulinsäure wird aus wäßrigen Lösungen mit Äther ausgeschüttelt.

α) Nachweis. αα) Nach KOSSEL und NEUMANN<sup>2</sup>. Lävulinsäure gibt mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge eine Rotfärbung, die auf Zusatz von Essigsäure in Himbeerrot übergeht. Nach L. GRÜNHUT<sup>3</sup> kann noch 1 mg Lävulinsäure in 0,1%iger Lösung nachgewiesen werden.

ββ) Mit Jod und Natronlauge entsteht schon in der Kälte Jodoform.

γγ) Mikrochemischer Nachweis nach H. BEHRENS<sup>4</sup>. Mit Phenylhydrazinacetat entsteht eine Trübung; aus der sich in kurzer Zeit rhomboidische und symmetrische sechsseitige Tafeln und Stäbchen bilden.

β) Bestimmung nach L. GRÜNHUT<sup>3</sup>. Die Bestimmung erfolgt durch Oxydation zu Essigsäure. Zu 50—75 ccm Lösung (etwa 100—180 mg Säure enthaltend), setzt man 4 g Chromtrioxyd und 20 ccm verd. Schwefelsäure ( $d = 1,15$ ) und kocht 2 Stunden am Rückflußkühler. Unter Ersatz des übergehenden Wassers destilliert man die Essigsäure über und titriert mit 0,1 N.-Kalilauge. 1 Äquivalent Lävulinsäure = 1 Äquivalent Essigsäure. — Zur weiteren Kontrolle kann überdies auch noch das verbrauchte Chromation ermittelt werden. Zu diesem Zwecke setzt man statt des Chromtrioxyds eine genau abgemessene Menge N.-Kaliumbichromatlösung (49,03 g/l), füllt nach der Oxydation auf ein bestimmtes Volumen und bestimmt im aliquoten Teil den Chromatüberschuß jodometrisch, aus dem anderen Teile destilliert man die gebildete Essigsäure ab, um auch deren Menge acidimetrisch zu ermitteln. 1 Millimol Lävulinsäure entspricht 14 ccm N.-Bichromatlösung. Zweckmäßig setzt man zu 30 ccm Lävulinsäurelösung 25 ccm N.-Kaliumbichromatlösung und 30 ccm konz. Schwefelsäure. Etwa vorhandene Ameisensäure wird unter diesen Bedingungen glatt zu Kohlendioxyd und Wasser oxydiert. 1 Millimol Ameisensäure entspricht 2 ccm N.-Bichromatlösung. Ihre Bestimmung geschieht in einem besonderen Anteile der zu untersuchenden Lösung mittels Quecksilberchlorids; um Ausscheidung von lävulinsäurem Quecksilber zu verhindern, genügt es, nach der Reaktion Salzsäure zuzusetzen und den Niederschlag mit salzsäurehaltigem Wasser zu waschen.

### III. Nachweis und Bestimmung der organischen Säuren nebeneinander.

#### A. Nachweise.

Für den Nachweis von organischen Säuren nebeneinander hat bereits C. R. FRESSENTU einen allgemeinen Gang ausgearbeitet. Daneben gibt es eine

<sup>1</sup> O. WARBURG, F. KUBOWITZ u. W. CHRISTIAN: Biochem. Zeitschr. 1930, **227**, 250.

<sup>2</sup> KOSSEL u. NEUMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1894, **27**, 2220.

<sup>3</sup> L. GRÜNHUT: Z. 1921, **41**, 261.

<sup>4</sup> H. BEHRENS: Chem.-Ztg. 1902, **26**, 1152.

Reihe von Verfahren, die für den Nachweis einzelner Gruppen von Säuren anwendbar sind, darunter auch mikrochemische Verfahren.

### 1. Allgemeiner Gang zum Nachweis organischer Säuren.

Das Verfahren nach C. R. FRESENIUS<sup>1</sup> beruht auf der Anwendung der Gruppenreagenzien: Salzsäure, Calciumchlorid und Ferrichlorid. Der Gang ist aus der Übersicht auf S. 1147 ersichtlich.

H. SCHMALFUSS und K. KEITEL<sup>2</sup> haben ebenfalls einen Trennungsgang für organische Säuren ausgearbeitet, der in erster Linie für den Nachweis der Säuren in Pflanzenauszügen bestimmt ist und sich zur Identifizierung der einzelnen Säuren meist mikrochemischer Reaktionen bedient.

### 2. Nachweis von Ameisensäure neben Essigsäure.

Nach L. BONNES<sup>3</sup> versetzt man 2—4 ccm der Untersuchungsflüssigkeit mit überschüssiger Schwefelsäure, destilliert etwa  $\frac{3}{4}$  davon ab, neutralisiert das Destillat durch einen geringen Überschuß an Calciumcarbonat, dampft die Flüssigkeit, ohne sie zu filtrieren, zur Trockne und unterwirft den Rückstand in geeigneter Weise der trockenen Destillation. Man prüft das in 1—2 ccm Wasser aufgefangene Destillat einerseits mit LEYScher Rosanilindisulfidlösung auf Aldehyde, andererseits nach LEGAL (S. 1061) auf Aceton mit Nitroprussidnatrium. Gibt die LEYSche Probe eine positive Reaktion, so ist Ameisensäure vorhanden, auch wenn die LEGALSche Probe negativ ist. Fällt letztere positiv, erstere aber negativ aus, so ist Essigsäure allein zugegen, fallen beide Reaktionen positiv aus, so enthält die fragliche Lösung beide Säuren nebeneinander.

### 3. Mikrochemischer Nachweis von Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und i-Valeriansäure nach BEHRENS-KLEY<sup>4</sup>.

Schema I. Man geht von ungefähr 30 mg Substanz aus und digeriert die konz. wäßrige Lösung mit Kupfercarbonat, wobei man eine grüne Lösung *L* und einen grünen Niederschlag *K* erhält. Den Rückstand *K* zieht man mit kaltem Wasser aus. Der Wasserauszug liefert nach dem Verdunsten Butyrat in Form grüner Rauten und Sechsecke (50—80  $\mu$ ). Den Rückstand des Wasserauszugs erwärmt man mit Natronlauge und prüft die Lösung mit einem Zinksalz auf Valeriansäure. Von der Lösung *L* wird die Hälfte mit Schwefelsäure zersetzt und hiernach das Ganze destilliert. Destillat (a): Propionsäure, Essigsäure und wenig Buttersäure; im Rückstand (b): Essigsäure und Ameisensäure.

a) Aus den trockenen Kalksalzen zieht Alkohol Propionat aus; Prüfung mit Bariumacetat. Das Ungelöste prüft man mit Uranyl nitrat und Natriumformiat auf Essigsäure.

b) Der Rückstand wird abermals mit verd. Schwefelsäure destilliert und das Destillat mit Bleioxyd neutralisiert. Auf Zusatz von Alkohol entstehen Nadeln von Formiat. Zur Mutterlauge gibt man Calciumoxyd und prüft die Lösung des Kalksalzes mit Uranyl nitrat und Natriumformiat auf Essigsäure.

<sup>1</sup> C. R. FRESENIUS: Anleitung zur qualitativen chemischen Analyse, bearbeitet von TH. W. FRESENIUS, 17. Aufl., S. 595. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1919.

<sup>2</sup> H. SCHMALFUSS u. K. KEITEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1924, 138, 156.

<sup>3</sup> L. BONNES: Bull. Sciences pharmacol. 1913, 20, 99; C. 1913, I, 1364. — Vgl. auch J. ONODERA: Trennung der Ameisen-, Essig- und Milchsäure. Ber. Ohara-Inst. landwirtschaftl. Forsch. 1917, 1, 231; C. 1920, IV, 271.

<sup>4</sup> BEHRENS-KLEY: Organische mikrochemische Analyse, 2. Aufl., S. 326. Berlin: Julius Springer 1926.

Tabelle 7. Nachweis organischer Säuren nach C. R. FRESNIUS.  
(Ameisen-, Essig-, Oxal-, Bernstein-, Äpfel-, Wein-, Citronen-, Benzoe-, Salicyl- und Zimtsäure)

| Filtrat (nach Ausscheidung der Kationen der Gruppen II—IV)<br>f) $NH_4Cl + NH_4OH + CaCl_2$  |   |
|--|---|
| a) + HCl. Niederschlag: Zimtsäure (Benzoe-, Salicylsäure) nach etw. waiger Trennung von anorganischen Anteilen des Salzsäureniederschlags (mit Äther) in NaOH gelöst und ein Teil der neutralen Flüssigkeit mit $FeCl_3$ versetzt: | Filtrat: Citrat-, Malat-, Succinat-, Benzoat-, Salicylat-, Acetat-, Formiat.<br>k) + 3 Tle. Alkohol (80%) |
| b) ein Teil der neutralen Flüssigkeit mit $FeCl_3$ versetzt:   |   |
| c) Filtrat violett, Salicylsäure.  |   |
| d) ein Teil der Lösung in NaOH(a) mit HCl genau neutralisiert; + $MnSO_4$ Niederschlag: Manganozinamat;  |   |
| e) ein anderer Anteil der Lösung (a) nach MOHLER (S. 1126) auf Benzoesäure geprüft. Rotbraune Färbung, Benzoesäure.  |   |
| Niederschlag: Ferricinnamat, komplexes Ferribenzoat, Zimtsäure;  |   |
| Rückstand: Calciumoxalat. h) + $MnO_2 + H_2SO_4$ Kohlendioxyd, Oxalsäure.  |   |
| Filtrat: Calciumtartrat. i) gekocht. Niederschlag Weinsäure.   |   |
| Niederschlag: Calciumoxalat, Calciumtartrat. g) mit NaOH in der Kälte behandelt:   |   |
| Filtrat: Calciumtartrat.   |   |
| Niederschlag: Calciumcitrat, -malat, -succinat. l) in wenig HCl gelöst + $NH_4OH$ gekocht:   |   |
| Niederschlag: Citrat-, Malat-, Succinat-, Benzoat-, Salicylat-, Acetat-, Formiat.<br>k) + 3 Tle. Alkohol (80%)   |   |
| Filtrat: Benzoeat-, Salicylat-, Acetat-, Formiat. Alkohol weggekocht zur neutralen Lösung;   |   |
| p) + Ferrichlorid.   |   |
| q) Filtrat: In Gegenwart von Salicylat- von Acetat- von Benzoeat- ion (violett) Formiat- rot. Einzeluntersuchung auf Ameisen- und Essigsäure.  |   |
| Niederschlag: Complexes Ferribenzoat, Benzoesäure.   |   |
| Filtrat: Malat-, Succination + 3 Tle. Alkohol (80%). Niederschlag der Calciumsalze, abfiltriert, getrocknet. m) mit $HNO_3$ eingedampft, mit $Na_2CO_3$ gekocht, abfiltriert. Lösung + HCl; n) + $NH_4OH + CaCl_2$ .               |   |
| Niederschlag: Citronensäure  |   |
| Filtrat: Succination o) + 3 Tle. Alkohol, Niederschlag: Calciumoxalat, u. Malatation, Äpfelsäure Bernsteinsäure.   |   |

Schema II (Anwendung von Lösungsmitteln). Man zieht die trockenen Kalksalze mit Alkohol aus; der Rückstand (*K*) enthält Formiat und Acetat; die Lösung (*L*): Propionat, Butyrat, Valerat. Ein Teil von *K* wird mit Ceronitrat auf Ameisensäure geprüft, ein anderer Teil mit Natrium-Uranylpropionat oder Uranyl-nitrat und Natriumformiat auf Essigsäure. — Aus der Lösung *L* vertreibt man den Alkohol und prüft mit Bariumacetat auf Propionsäure. Zur Mutterlauge gibt man Kupfernitrat und ein wenig Essigsäure. Grüne Tröpfchen, mit verd. Alkohol grüne Quadrate (16—30  $\mu$ ): Valeriansäure, grüne Rauten und Sechsecke (50—80  $\mu$ ): Buttersäure.

#### 4. Nachweis von Ameisensäure neben Oxalsäure und Weinsäure nach F. KRAUSS und H. TAMPKE<sup>1</sup>.

Mit Resorcin und Schwefelsäure entsteht bei Anwesenheit von Ameisensäure ein orangeroter Ring, der sich bei gleichzeitiger Entwicklung von Kohlenoxyd nach oben verbreitert. Bei der Reaktion mit Resorcin und Schwefelsäure auf Oxalsäure ist eine Spur Wasser erforderlich, um die blaue Farbe hervorzurufen. Weinsäure liefert eine tiefrote Färbung. Bei gleichzeitiger Anwesenheit der drei Säuren treten die Farbringe nicht gemischt, sondern übereinander auf, von oben zuerst der Ameisensäure-, dann der Oxalsäure- und zuunterst der Weinsäurering. 0,2 g Oxalsäure, 0,1 g Ameisensäure und 0,02 g Weinsäure können nebeneinander nachgewiesen werden. Zur Prüfung löst man 0,2 g Resorcin in 5 cm der zu untersuchenden schwach sauren Lösung und unterschichtet vorsichtig mit 10 cm konz. Schwefelsäure. Der Weinsäurering erscheint bei sehr vorsichtigem Erwärmen der Schwefelsäure, die anderen eher. Die Ringe selbst dürfen nicht erwärmt werden.

#### 5. Mikrochemischer Nachweis von freier und gebundener Oxal-, Bernstein-, Äpfel-, Wein- und Citronensäure nebeneinander nach G. KLEIN und O. WERNER<sup>2</sup>.

Das Verfahren beruht auf der fraktionierten Sublimation der Säuren. Die freien Säuren sublimieren entweder völlig unzersetzt (Oxalsäure, Bernsteinäure), oder als Anhydride (Äpfelsäure, Weinsäure und Citronensäure), welche in die wasserhaltige ursprüngliche Form zurückführbar sind. Der Nachweis beruht auf der Darstellung des geeignetsten Salzes. Die Ausbeute ist auf diesem Wege bei allen Säuren reichend quantitativ. Da die Sublimationstemperaturen der einzelnen Säuren verschieden sind und genügend weit auseinander liegen, ist eine vollkommene Fraktionierungsmöglichkeit gegeben. Liegen die Säuren in beliebiger Bindung vor, so können sie durch Phosphorsäurezusatz für die Sublimation frei gemacht werden.

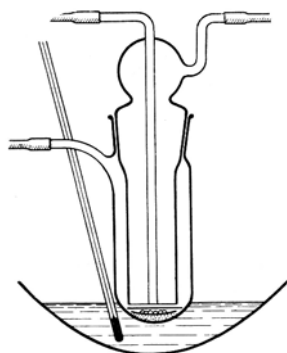


Abb. 8.  
Mikrosublimationsapparat  
nach KLEIN und WERNER  
(2:1).

Der Sublimationsapparat (Abb. 8) besteht aus einem Mantel und dem Kühler, der in den konischen Hals des Mantels vakuumdicht eingeschliffen ist. Der Mantel trägt eine seitliche Tubulierung zum Evakuieren. In den Kühler sind zwei Glasröhrchen eingeschmolzen, von denen das bis zum Boden des Kühlers reichende der Wasserzu-, das kürzere der -ableitung dient. Der Abstand zwischen der unteren, plangeschliffenen Kühltürfläche und dem Boden des Mantels beträgt 8 mm. Zur Aufnahme der Substanz dient ein flaches Schälchen aus 0,3 mm starkem Kupferblech, welches auf feinen Eisenfeilspänen liegt. Als Vorlage zum Auffangen des Sublimats wird ein rundes Deckglas (20 mm) verwendet, das mit einem Tropfen wasser-

<sup>1</sup> F. KRAUSS u. H. TAMPKE: Chem.-Ztg. 1920, 45, 521.

<sup>2</sup> G. KLEIN u. O. WERNER: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 143, 141.

freien Glycerins an der planen unteren Kühlerfläche angeklebt wird. Der Abstand vom Boden des Schälchens zum Deckglas soll 4—5 mm betragen. Der Apparat wird zum Gebrauch in geeigneter Weise an einem Stativ befestigt<sup>1</sup>. Das Anheizen geschieht in einem Ölbad, dessen Temperatur gemessen wird und in das der unterste Teil des Apparates 2 cm tief eintaucht. Evakuiert wird mit einer Wasserstrahlpumpe bis etwa 10 mm Druck. Durch den Kühler muß während der ganzen Sublimation Wasser von der Leitung laufen.

Die Sublimat der Oxalsäure (Abb. 9a) bestehen in der Regel zuerst aus längeren Prismen, welche bald in kleinere Kryställchen zerfallen. In diesem Sublimat wird die Oxalsäure, wenn größere Mengen vorliegen, vorteilhaft als Strontiumsalm, bei geringen Mengen als Calciumsalm nachgewiesen.

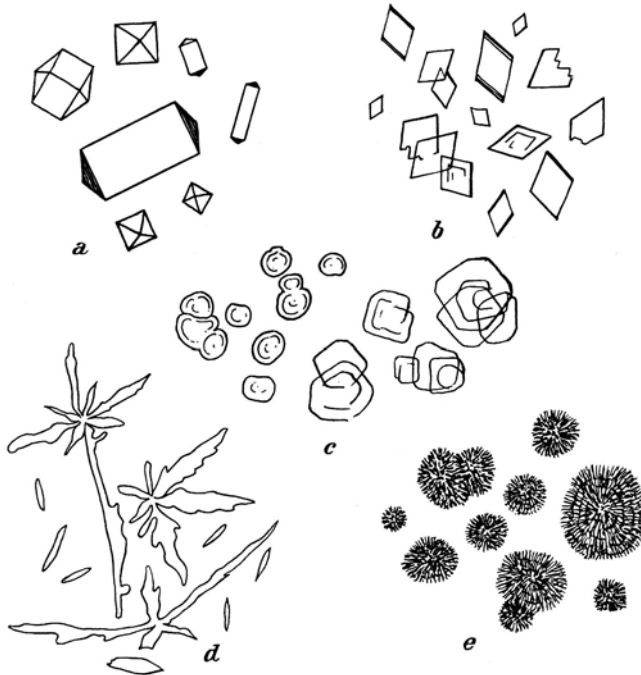


Abb. 9. Mikrosublimat von a Oxalsäure, b Bernsteinsäure, c Äpfelsäure, d Weinsäure, e Citronensäure nach KLEIN und WERNER.

Die Sublimat der Bernsteinsäure (Abb. 9b) bestehen aus kleinen Kryställchen, und werden am besten als Bleisalm charakterisiert.

Bei der Sublimation der Äpfelsäure bekommt man auch bei den kleinsten Mengen ein zunächst amorphes Sublimat, in welchem sich bereits beim Liegen an der Luft nach einiger Zeit zerfließliche Nadelchen von Äpfelsäure bilden. Für die leichte und glatte Umwandlung des Sublimates in Äpfelsäure wird das Sublimat mit einem Tropfen 1—5%iger Silbernitratlösung versetzt, in einem auf 40° erhitzten Wärmeschrank, in dem sich eine flache Schale mit 5%iger Ammoniaklösung befindet, gebracht. Nach 10—20 Minuten sind die Anhydride vollständig in das Silbersalm der Äpfelsäure übergeführt. Es entstehen klare Kügelchen, Scheibchen, manchmal Rosetten von 4 und 8eckigem Umriß, seltener auch Nadelchen (Abb. 9c), unter Umständen auch auskrystallisierendes Silbernitrat, das die Beobachtung stört; es kann durch Anhauchen leicht in Lösung gebracht werden.

<sup>1</sup> Der Apparat ist erhältlich bei Ewald Otto, Glasbläserei Wien IX, Währingerstr. 26.

Weinsäure liefert bei der Sublimation ein amorphes Sublimat, in dem beim Liegen an der Luft die wasserhaltige Weinsäure allmählich auskristallisiert. Es entstehen sehr charakteristische Wetzsteinformen, bei größeren Mengen auch Zerrformen (Abb. 9d). Die Umwandlung des Anhydrids in die Säure erfolgt in gleicher Weise wie bei der Äpfelsäure angegeben. Es empfiehlt sich jedoch, zuerst durch eine halbstündige Behandlung im Wärmeschrank das Ammoniumtartrat (Wetzsteinformen) und dann erst aus diesem mit Silbernitrat und Essigsäure das Silberbitartrat darzustellen, welches größtenteils in knieförmigen Zwillingen auskristallisiert.

Bei der Sublimation der Citronensäure entsteht ein amorpher Beschlag, welcher auch nach Behandlung mit ammoniakalischen Wasserdämpfen bei 40° schwer zur Krystallisation zu bringen ist. Doch läßt sich leicht das Silbersalz der Citronensäure darstellen, wenn man genau so wie bei der Äpfelsäure verfährt. Man erhält vorwiegend Sphärite aus feinen Nadeln gebildet (Abb. 9e).

Die Sublimationstemperatur wird außen im Ölbad gemessen. Für Oxalsäure beträgt sie etwa 110°, für Bernsteinsäure etwa 130°, für Äpfelsäure etwa 145°, für Citronensäure etwa 170° und für Weinsäure etwa 195°. Die Temperatur ist besonders bei den drei letzten Säuren einige Zeit konstant zu halten, und zwar so, daß sie ungefähr 10 Minuten lang in einem Bereich von höchstens 6° um die angegebenen Sublimationstemperaturen schwankt. Man hat dadurch die Gewähr, daß auch größere Mengen bis etwa 200  $\gamma$  restlos sublimieren. Da die Sublimationstemperaturen so weit auseinander liegen, daß eine Verflüchtigung der nächsthöheren Säure bei der Sublimation der nächst niedrigeren nicht oder nur in Spuren erfolgt, ist eine fast restlose Fraktionierung zwischen den kleinsten, zum Nachweis noch in Betracht kommenden Mengen von etwa 2—5  $\gamma$  möglich.

Bei der Untersuchung eines Gemisches kann man also aus einer Probe auf wechselten Deckgläsern sämtliche Fraktionen erhalten. Nur ist zu beachten, daß der Apparat vor jedesmaligem Deckglaswechseln auskühlen muß (also aus dem heißen Ölbad herausgehoben werden muß), um Zersetzung der Substanz unter gewöhnlichem Druck zu vermeiden. Zur Aufspaltung der gebundenen Säuren verwendet man bis zu Substanzmengen von 200  $\gamma$  einen Zusatz von etwa 0,5 mg konz. Phosphorsäure. Die Methode ist besonders für die Isolierung der Säuren aus Pflanzengewebe voll anwendbar.

## 6. Mikrochemischer Nachweis von Milchsäure und Äpfelsäure neben Citronensäure.

Der Umstand, daß sich bei der Einwirkung bestimmter Reagenzien auf Milchsäure und Äpfelsäure Acetaldehyd bildet, und aus Citronensäure Aceton entsteht, ermöglicht es, nach C. GRIEBEL und F. WEISS<sup>1</sup> die genannten Stoffe mit Hilfe der Mikrobechermethode nachzuweisen.

Zur Ausführung dieses Verfahrens bringt man eine kleine Probe des Untersuchungsmaterials in einen Mikrobecher (S. 1026) von etwa 0,5—1 cm Fassungsvermögen, legt ein Deckgläschen auf, das durch Reiben zwischen den Fingern leicht eingefettet und dann kurz vor dem Versuch auf der Unterseite mit einem etwa 2 mm großen Tröpfchen der Reagensflüssigkeit beschickt wird, und erwärmt die Vorrichtung auf einem schwach geheiztem Wasserbade. Sobald sich in der Reagensflüssigkeit krystallinische Ausscheidungen bemerkbar machen oder sobald das Deckgläschen einen Beschlag von feinen Wassertropfchen zeigt, wird das Becherehen vom Wasserbade entfernt und zum Abkühlen 10—20 Minuten beiseite gestellt. Dann bringt man das Deckgläschen entweder mit dem Reagenströpfchen nach oben auf einen gewöhnlichen Objektträger oder besser, mit dem Tröpfchen nach unten, auf einen mit Vaselining versehenen hohlgeschliffenen Objektträger und untersucht zunächst bei schwacher, später bei stärkerer Vergrößerung.

Um nach dem Mikroverfahren auf Citronensäure zu prüfen, wird eine Probe des Untersuchungsmaterials erforderlichen Falles von störenden Stoffen (flüchtigen Alkoholen, Aldehyden und Ketonen) befreit und mit einigen Tropfen Wasser versetzt, wenn nicht genügend Feuchtigkeit vorhanden sein sollte, um

<sup>1</sup> C. GRIEBEL u. F. WEISS: Z. 1928, 56, 158.

ein Eintrocknen des Reagenstropfens zu vermeiden. Hierauf wird ein Tropfen einer 0,05%igen Kaliumpermanganatlösung hinzugefügt, dann ein Deckgläschen mit einem Tropfen m- oder p-Nitrophenylhydrazin aufgelegt, und das Becherchen in der oben beschriebenen Weise behandelt. Können hierbei Acetonhydrazonkrystalle nicht festgestellt werden, so wird nach weiterem Hinzufügen von je einem Tropfen der Permanganatlösung die Mikrodestillation so oft wiederholt, bis eine schwache Violettfärbung der Flüssigkeit während des Erwärmens nicht mehr verschwindet. Liegt eine viel Permanganat verbrauchende Substanz vor, so versetzt man die zu untersuchende Probe tropfenweise mit 0,1%iger oder 0,5%iger Kaliumpermanganatlösung, bis eine 2—3 Sekunden bestehende ganz schwache Violettfärbung bleibt. Dann wird erwärmt und in der oben angegebenen Weise weiter verfahren.

Soll auf Milch- und Äpfelsäure geprüft werden, so empfiehlt es sich, da die p-Nitrophenylhydrazonkrystalle des Acetaldehydes und des Acetons sehr ähnlich sind, mit m-Nitrophenylhydrazin die Mikrodestillation zu wiederholen, da dieses Reagens mit Acetaldehyd und Aceton gänzlich verschiedene Krystalle liefert. Mit Hilfe der Mikrobechermethode können in dieser Weise noch etwa 70  $\gamma$  Citronensäure in 1 ccm wäßriger Lösung in kurzer Zeit, etwa 10 Minuten, auch bei Gegenwart von Milch- und Äpfelsäure nachgewiesen werden. Die Mengen dieser Säuren dürfen allerdings nicht erheblich größer sein, als die vorhandene Citronensäuremenge.

Zum Nachweis von Milchsäure wird die von störenden Stoffen befreite Probe in einem Mikrobecher, wenn nötig nach Zusatz von 2—3 Tropfen Wasser, mit 1 Tropfen einer 0,5%igen Kaliumpermanganatlösung versetzt. Bei Anwendung einer größeren Menge von Permanganat kann der Nachweis geringer Mengen Milchsäure sehr leicht mißlingen. Nach dem Hinzufügen des Permanganats wird auf das Becherchen ein Deckgläschen mit einem Reagenstropfen (p- oder m-Nitrophenylhydrazin) aufgelegt und wie oben weiter behandelt. Auf diese Weise ist es möglich, noch 100  $\gamma$  freie oder gebundene Milchsäure nachzuweisen. In gleicher Weise kann auch der Nachweis von Äpfelsäure erbracht werden. Da bei der Oxydation von Äpfelsäure auch mit verhältnismäßig größeren Mengen Permanganat Acetaldehyd entsteht, kann man mit einem Überschuß von Permanganat Äpfelsäure auch bei Gegenwart von Milchsäure nachweisen. Man oxydiert dann mit 1%iger Permanganatlösung, indem man von dieser so viel hinzufügt, daß die Untersuchungsflüssigkeit auch noch nach dem Erwärmen kräftig violett gefärbt ist. 50  $\gamma$  Äpfelsäure können noch in 1 ccm Flüssigkeit nachgewiesen werden.

## 7. Nachweis von Äpfel-, Wein- und Citronensäure.

Nach J. A. SANCHEZ<sup>1</sup> gibt Äpfelsäure beim Erhitzen im trockenen Reagensglas bei etwa 200° ein feinkrystallines Sublimat von Fumarsäure, die durch ihre Schwerlöslichkeit in kaltem Wasser und nach Zusatz von wenig Ammoniak durch das sehr wenig lösliche Silbersalz neben Weinsäure und Citronensäure sicher zu erkennen ist (Menge der angewandten Substanz 0,02—0,05 g). Weinsäure gibt unter den gleichen Bedingungen Brenztraubensäure, die mit Wasser, 30%iger Natronlauge und o-Nitrobenzaldehyd Indigo gibt. Citronensäure gibt nach längerem Erhitzen die gleiche Reaktion. Um beide Säuren zu unterscheiden, nimmt man das Kondensat mit wenig Wasser auf, macht mit Ammoniak alkalisch, dampft den Überschuß fort und setzt überschüssige 5%ige Silbernitratlösung zu. Löst sich der entstandene Niederschlag in der Hitze und erscheint er beim Abkühlen wieder, so ist Citronensäure vorhanden; sie kann

<sup>1</sup> J. A. SANCHEZ: *Anales Asoc. quim. Argentina* 1926, **14**, 356; *C.* 1927, **II**, 302.



auch nach IMBERT in essigsaurer Lösung mit einer 2%igen Kaliumpermanganatlösung durch Erhitzen festgestellt werden. Eisessig und Nitroprussidnatrium geben mit wenig Ammoniak einen violetten Ring, der über Tiefblau smaragdgrün wird; letzteres ist wichtig.

### 8. Nachweis von Weinsäure und Citronensäure.

a) Nach W. PARRI<sup>1</sup> trägt man in einige ccm einer Lösung von 3 g Ammoniumphosphormolybdat und 0,3 g Ammoniumvanadat in 100 ccm konz. Schwefelsäure etwas von der auf Citronensäure zu prüfenden Weinsäure ein; es bildet sich bei Anwesenheit von Citronensäure ein blauer Ring, bzw. es färbt sich das Reagens blau. Beim Erwärmen tritt ein Farbumschlag in Grün ein, der beim Kühlen wieder in Blau umschlägt. Zimtsäure gibt bei gleicher Behandlung ein flüchtiges Rotviolett, welches beim Erwärmen in Kastanienbraun, beim Abkühlen in Veilchenblau umschlägt; Bernsteinsäure gibt in der Kälte und Wärme eine goldgelbe Farbe; Äpfelsäure wird in der Kälte goldgelb, in der Hitze hellblau und behält letzteren Farbton auch beim Abkühlen bei.

b) Nach L. ROSSI<sup>2</sup> können Weinsäure und Citronensäure auf Grund ihrer verschiedenen Dissoziationskonstanten (für die Weinsäure =  $0,97 \cdot 10^{-3}$ , für die Citronensäure =  $0,82 \cdot 10^{-3}$ ) voneinander unterschieden werden.  $K_1 > K_2$ , d. h. die Citronensäure enthält in wäßriger Lösung bei gleicher Konzentration eine größere Anzahl nicht dissoziierter Moleküle als die Weinsäure. Wird eine Weinsäurelösung mit Alkalimeta- oder -pyrovanadat (in festem Zustande oder in wäßriger Lösung) versetzt, so entsteht die für die Bildung von Polyvanadat charakteristische orangefarbene Färbung, die auch Mineralsäuren hervorrufen. Mit Citronensäure bleibt unter den gleichen Bedingungen die ursprüngliche gelbe Farbe der Vanadinlösung bestehen. Die genannten Reaktionen hängen von dem sauren Bestandteil der beiden Säuren, nicht von dem Tartrat- oder Citratanion ab. Es verläuft deshalb die Farbenreaktion auch nur mit den sauren Salzen der Weinsäure positiv.

c) Nach CALLETET<sup>3</sup> gibt man zu 10 ccm gesättigter Kaliumbichromatlösung 1 g der zu prüfenden Citronensäure. Ist keine Weinsäure vorhanden, so tritt innerhalb 10 Minuten keine Farbenänderung ein. Bei 1% Weinsäure ist die Lösung kaffeebraun, bei 5% schwarzbraun geworden.

d) Nach L. CRISMER<sup>4</sup> versetzt man 1 g gepulverte Citronensäure mit 1 ccm wäßriger Ammonmolybdatlösung (1 + 4), gibt 2—3 Tropfen 0,25%ige Wasserstoffsperoxydlösung hinzu und erwärmt unter Umschütteln 3 Minuten lang auf dem Wasserbade. Reine Citronensäure färbt sich hierbei gelb, Weinsäure bewirkt Blaufärbung. Es läßt sich so noch 1 mg Weinsäure in 1 g Citronensäure nachweisen.

### 9. Nachweis von Benzoe-, Salicyl- und Zimtsäure.

#### a) Nachweis von Benzoe- und Salicylsäure.

Nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>5</sup> wird die Salicylsäurereaktion mit Eisenchlorid durch Benzoesäure (S. 1135) nicht beeinflusst; sie stört aber ihrerseits die MOHLERSche Benzoesäurereaktion (S. 1126) durch ihre starke Gelbfärbung. Die Salicylsäure muß daher mit Kaliumpermanganat, wie nachstehend unter b)  $\beta$ ) angegeben, zerstört werden, wobei aber meist größere Mengen der Reagenzien erforderlich sind.

<sup>1</sup> W. PARRI: Giorn. Chim. ind. appl. 1924, 6, 537; C. 1925, I, 994.

<sup>2</sup> L. ROSSI: Ann. Chim. analyt. appl. 1928, 18, 366; C. 1928, II, 2386.

<sup>3</sup> CALLETET: Journ. Pharm. d'Anvers 33, 449; Zeitschr. analyt. Chem. 1878, 17, 499.

<sup>4</sup> L. CRISMER: Bull. Soc. chim. Paris [3] 6, 29; Zeitschr. analyt. Chem. 1893, 32, 96.

<sup>5</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.

## b) Nachweis von Benzoe- und Zimtsäure.

α) Nach W. L. SCOVILLE<sup>1</sup> eignet sich hierfür die Manganprobe. Cinnamate geben mit Manganosalzen — wenn auch langsam — einen allmählich krystallin werdenden Niederschlag (S. 1139), während Benzoate keinen Niederschlag geben. Das Verfahren eignet sich aber nicht für den Nachweis von geringen Mengen Zimtsäure; dafür ist das folgende Verfahren geeigneter.

β) Nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>2</sup>. Das Verfahren beruht auf der verschiedenen Wasserlöslichkeit von Benzoesäure (2,7 mg/ccm) und Zimtsäure (0,28 mg/ccm); bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat liefern 0,28 mg Zimtsäure 0,23 mg Benzoesäure.

Der Petrolätherrückstand wird mit 1 ccm Wasser im Wasserbade erhitzt und abgekühlt; die Zimtsäure scheidet sich bis auf 0,28 mg in Krystallbüscheln ab; diese werden, ohne nachzuwaschen, durch ein 3 cm-Filter abfiltriert und nach S. 1139 auf Zimtsäure geprüft. Das Filtrat wird mit 1 Tropfen N.-Natronlauge und 1 Tropfen Kaliumpermanganatlösung aufgeköcht und nach dem Abkühlen werden 1—2 Tropfen Bisulfidlösung hinzugefügt, mit 1 Tropfen, nötigenfalls noch mehr Schwefelsäure (1:4) angesäuert, wobei sich die Lösung entfärben muß. Man extrahiert mit einigen ccm Äther und dampft diesen in einem Reagensglase ab. Falls kein Rückstand bleibt ist Benzoesäure nicht vorhanden; ein Rückstand wird nach S. 1126 auf Benzoesäure geprüft. Eine mehr als spurenweise Rotfärbung zeigt ursprünglich vorhandene Benzoesäure an; eine Reaktion von etwa 0,2 mg wird dabei unberücksichtigt gelassen.

## c) Nachweis von Benzoe-, Salicyl- und Zimtsäure.

Nach C. VON DER HEIDE und F. JACOB<sup>3</sup> verfährt man, wie folgt:

Die Benzoesäure führt man nach A. JONESCU mit Wasserstoffsperoxyd in Salicylsäure über (S. 1127) und weist diese durch die Reaktion mit Eisenchlorid (S. 1135) nach.

Die Salicylsäure weist man im Chloroformauszuge der mit Schwefelsäure angesäuerten Lösung durch die Reaktion mit Eisenchlorid (S. 1135) nach.

Die Zimtsäure weist man durch Oxydation zu Benzaldehyd (S. 1140) nach, den man am Geruche erkennt; dann oxydiert man den Benzaldehyd zu Benzoesäure und weist diese mittels der MOHLERSchen Reaktion (S. 1126) nach.

## 10. Nachweis von Benzoe-, Salicyl-, Zimt-, p-Chlor- und p-Oxybenzoesäure und deren Estern.

a) Verfahren nach R. FISCHER und FR. STAUDER<sup>4</sup>.

Die Konservierungsmittel werden, sofern sie nicht als solche vorliegen, dem zu untersuchenden Lebensmittel durch Extraktion mit Äther entzogen. Man verdunstet den Äther und zieht den Rückstand mit Petroläther aus; p-Oxybenzoesäure ist darin unlöslich und dadurch nachweisbar. Man verdunstet den Petroläther in einem Schälchen und unterwirft den Rückstand der Mikrosublimation. Diese wird unter dem Mikroskop, beginnend mit 50°, vorgenommen. Die bei einer bestimmten Temperatur erhaltenen Sublimate werden im Polarisationsmikroskope untersucht und ihr Schmelzpunkt unter dem Mikroskop bestimmt, und darauf werden Identitätsreaktionen mit dem Sublimat angestellt.

<sup>1</sup> W. L. SCOVILLE: Amer. Journ. Pharm. 1908, 79, 549; C. 1908, I, 413.

<sup>2</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.

<sup>3</sup> C. VON DER HEIDE u. F. JACOB: Z. 1910, 19, 137.

<sup>4</sup> R. FISCHER u. FR. STAUDER: Z. 1931, 62, 658 u. R. FISCHER: Z. 1934, 67, 161.

Es sublimieren und werden nachgewiesen:

|                             | Temperatur | Schmelzpunkt               | Reaktion                      |                        |                           |
|-----------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Benzoessäure . . . . .      | 55—60°     | 121°                       | mit Kupfer- und Mercuriacetat |                        |                           |
| Ester der                   | 65—70°     | 131°                       | auf Methylalkohol             | } MILLON'S<br>Reaktion |                           |
| p-Oxy- { Methyl-ester       |            | 116° (112,5°) <sup>1</sup> | 96,2°                         |                        | nach v. FELLEBERG S. 1132 |
| benzoessäure { Äthyl-ester  |            |                            | 142°                          |                        | mit Silbernitrat          |
| o-Chlorbenzoessäure . . . . | um 75°     | 157°                       | mit Eisenchlorid              |                        |                           |
| Salicylsäure . . . . .      | um 80°     | 133°                       | mit Permanganat               |                        |                           |
| Zimtsäure . . . . .         | ab 90°     | 236° (243°) <sup>1</sup>   | mit Silbernitrat              |                        |                           |
| p-Chlorbenzoessäure . . . . | ab 95°     | 213—214°                   | mit MILLON'S Reaktion         |                        |                           |
| p-Oxybenzoessäure . . . .   | 135°       |                            |                               |                        |                           |

Außer der Sublimationstemperatur und dem Schmelzpunkt, sowie den Krystallformen der Sublimata dient zur Trennung der obigen Konservierungsmittel noch folgendes Verhalten:

1. Benzoessäure von o-Chlorbenzoessäure. Man löst das Sublimat in einem Tropfen Wasser und prüft die Lösung mit Kupferoxyd in der BUNSEN-Flamme: Grünes Aufleuchten läßt auf Chlor schließen.

2. Benzoessäure von den p-Oxybenzoessäureestern. Benzoessäure und einer der Ester können möglicherweise noch durch fraktionierte Sublimation getrennt werden, während die Gegenwart von 2 oder 3 Estern außer durch die Krystallform des Sublimates auch durch die Schmelzpunktsdepression in die Erscheinung tritt. Die p-Oxybenzoessäure und ihre Ester geben die MILLON'Sche Reaktion (S. 1130). Zur Entscheidung der Frage, welcher der 3 Ester vorliegt, verseift man diese, oxydiert die abgeschiedenen Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden (S. 1131) und weist diese durch die GRIEBEL'Sche Mikrobechermethode (S. 1026) nach.

3. Salicylsäure von den p-Oxybenzoessäureestern. Die Trennung erfolgt ähnlich wie bei 2; außerdem wird die Salicylsäure durch die Eisenchloridreaktion nachgewiesen.

4. Salicylsäure von p-Chlorbenzoessäure. Die Salicylsäure wird mit Eisenchlorid und die p-Chlorbenzoessäure mit Kupferoxyd wie bei 1. nachgewiesen. Die Salicylsäure kann auch durch Kaliumpermanganat zerstört und die p-Chlorbenzoessäure durch Sublimation und Schmelzpunkt erkannt werden.

5. Salicylsäure von Zimtsäure. Die Salicylsäure wird mit Eisenchlorid nachgewiesen und die Zimtsäure durch Kaliumpermanganat über Benzaldehyd in Benzoessäure übergeführt.

6. Zimtsäure von p-Chlorbenzoessäure. Die Zimtsäure wird mit Kaliumpermanganat in Benzaldehyd übergeführt und dieser mit p-Nitrophenylhydrazin nachgewiesen, entweder nach C. GRIEBEL (S. 1026) oder durch den Schmp. 192° (S. 1024). Dann wird die Zimtsäure weiter zu Benzoessäure oxydiert und die p-Chlorbenzoessäure durch Sublimation bei 95° und den Schmelzpunkt des Sublimats (236°) nachgewiesen.

#### b) Analysengang nach TH. v. FELLEBERG und ST. KRAUZE<sup>2</sup>.

Für den Nachweis dieser Säuren wurde folgender Analysengang ausgearbeitet:

α) Die durch Extraktion der sauren Substanz erhaltene Ätherlösung wird abdestilliert, der Rückstand mit einigen Tropfen Wasser befeuchtet und wiederholt (bis 6mal) mit je 10 ccm Petroläther ausgeschüttelt. Sollte beim Mischen der einzelnen Petrolätherfraktionen sich Krystalle ausscheiden, so werden diese gesondert untersucht.

β) Der in Petroläther unlösliche Rückstand wird mit MILLON'S Reagens- auf p-Oxybenzoessäure untersucht.

γ) Von der Petrolätherlösung, sofern sie beim Eindunsten einen Rückstand hinterläßt — im anderen Falle fehlen die übrigen obigen Konservierungsmittel —, wird 1 ccm nach S. 1135 auf Salicylsäure geprüft. Ist diese vorhanden, so wird 1 ccm mit MILLON'S Reagens geprüft und die Stärke der Färbung mit der Salicylsäurereaktion nach S. 1130 verglichen. Ist die MILLON'Sche Reaktion eher etwas schwächer als die Salicylsäurereaktion, so sind Ester der p-Oxybenzoessäure nicht vorhanden, ist sie stärker, so sind solche Ester vorhanden.

δ) Bei Abwesenheit von Salicylsäure wird ebenfalls mit MILLON'S Reagens auf die Ester geprüft. Wenn die Probe, ebenso wie unter γ), negativ ausfällt, wird der Petroläther

<sup>1</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111. Vgl. auch Mikrochemie 1931, 8, 330 u. 1933, 13, 123.

<sup>2</sup> TH. v. FELLEBERG u. ST. KRAUZE: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1932, 23, 111.

abdestilliert; hinterbleibt dabei ein Rückstand, so wird dieser nach  $\eta$ ) auf Benzoe-, Zimt- und Mikrobinsäure (Mischung von o- und p-Chlorbenzoesäure) geprüft. Hinterbleibt kein Rückstand, so sind diese Säuren nicht vorhanden; die Untersuchung ist dann beendet.

$\epsilon$ ) Sind Ester der p-Oxybenzoesäure vorhanden, ist Salicylsäure aber nicht vorhanden, so wird nach dem Verteilungskoeffizienten unter  $\theta$ ) geprüft, um welche Ester es sich handelt. Deutet die Verteilung zwischen Petroläther und Wasser auf mehrere Ester hin, so werden diese nach Abtrennung der Säuren ( $\zeta$ ) nach S. 1133 auf die veresterten Alkohole geprüft.

$\zeta$ ) Sind Ester der p-Oxybenzoesäure neben Salicylsäure vorhanden, so werden diese folgendermaßen von den anwesenden Säuren getrennt: Die Petrolätherlösung von der Verteilung der Säuren zwischen Petroläther und Wasser ( $\theta$ ) wird abdestilliert, der Rückstand mit Äther aufgenommen und in einem Kolben mit wenigen Tropfen Natriumcarbonatlösung (10%) geschüttelt, wobei die Säuren in die Natriumcarbonatlösung gehen. Die Ätherlösung, welche die Ester enthält, wird abgedampft, der Rückstand wieder mit Petroläther aufgenommen und nach  $\theta$ ) oder nach S. 1133 geprüft.

$\eta$ ) Die Natriumcarbonatlösung, welche die Säuren enthält, wird mit einigen Tropfen Schwefelsäure (1:4) angesäuert und mit einigen cem Äther extrahiert und der Äther verdampft. Ist kein Rückstand geblieben, so sind Benzoe-, Zimtsäure sowie o- und p-Chlorbenzoesäure nicht vorhanden (s.  $\gamma$ ). Ist ein Rückstand vorhanden, so betrachtet man ihn unter dem Mikroskop und kann in gewissen Fällen aus der Krystallform wichtige Schlüsse ziehen.

Man löst nun den Rückstand in 1 cem Wasser unter Erwärmen und kühlt ab; krystallisiert dabei nichts aus, so sind Zimtsäure sowie o- und p-Chlorbenzoesäure nicht vorhanden. Man prüft dann die Lösung, nachdem man sie wieder mit Äther ausgezogen und den Äther in einem Reagensglase abgedampft hat, nach S. 1126 oder bei Anwesenheit von Salicylsäure nach S. 1152 auf Benzoesäure.

Ist beim Abkühlen eine krystalline Ausscheidung entstanden, so deuten bei der mikroskopischen Untersuchung feine Nadeln auf o- und p-Chlorbenzoesäure hin. Man filtriert durch ein 3 cm-Filterchen, löst den Rückstand in Äther und prüft davon einen Teil nach S. 1139 auf Zimtsäure und einen weiteren nach S. 1134 auf Mikrobinsäure. Das wäßrige Filtrat wird mit Äther ausgezogen und, falls beim Abdampfen ein Rückstand hinterbleibt, nach S. 1126 bzw. S. 1152 auf Benzoesäure geprüft.

$\theta$ ) Erkennung der Ester der p-Oxybenzoesäure und Salicylsäure nach dem Verteilungskoeffizienten. Man bringt auf den Boden eines Reagensglases mit eingeschlippenem Stopfen mit einer genauen Pipette 0,3 cem Wasser, gibt dazu 3 cem der zu untersuchenden Petrolätherlösung und schüttelt 1 Minute lang kräftig, jedoch ohne daß der Stopfen von der Flüssigkeit benetzt wird. Nachdem sich die Flüssigkeiten getrennt haben, gießt man die ganze Petrolätherschicht vorsichtig, ohne daß ein Tropfen der wäßrigen Schicht mitkommt, in ein Reagensglas. Man gießt nun in ein anderes Reagensglas von demselben Durchmesser 1 cem der ursprünglichen Petrolätherlösung. Beide Lösungen werden im Reagensglase vorsichtig verdampft und mit den Rückständen die MILLONsche Reaktion nach S. 1130 ausgeführt, wobei man 0,95 cem Mercurisulfatlösung und 1 Tropfen Nitritlösung zusetzt. Sollte die Reaktion so stark ausfallen, daß die Ausscheidung der roten Verbindung zu befürchten ist, so verwendet man 1—2 cem Mercurisulfatlösung.

Die Reaktionen in den beiden Gläsern werden colorimetrisch miteinander verglichen, indem man zu der stärkeren Lösung aus einer Bürette so viel Wasser hinzufügt, daß die beiden Färbungen in der Durchsicht gleich sind. Die Farbstärken bzw. die Flüssigkeitsvolumen sind den Gehalten proportional. Da bei der mit Wasser ausgeschüttelten Probe 3 cem verwendet worden sind, dividiert man ihr Volumen durch 3 und berechnet sodann das Verhältnis vor und nach der Ausschüttlung, indem man ersteres = 100 setzt.

Es verhalten sich vor und nach der Ausschüttlung:

|          | p-Oxybenzoesäure- |            |             |              |
|----------|-------------------|------------|-------------|--------------|
|          | Methylester       | Äthylester | Propylester | Salicylsäure |
| wie 100: | 20                | 47         | 72          | 21           |

Stimmt das gefundene Verhältnis mit einer dieser Zahlen bis auf einige Prozente überein, so liegt die betreffende Verbindung vor. Ob es sich um p-Oxybenzoesäure-Methylester oder Salicylsäure handelt, entscheidet der Ausfall der Salicylsäurereaktion.

### 11. Sonstige Verfahren.

a) Nachweis von Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure. K. R. HABERLAND<sup>1</sup> versuchte die Trennung dieser Säuren mittels der Calcium-, Barium-, Zink-, Blei- und Silbersalze.

<sup>1</sup> K. R. HABERLAND: Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38, 217.

b) **Nachweis von Oxal-, Milch-, Bernstein-, Äpfel-, Wein-, Citronensäure.** H. FRANZEN<sup>1</sup> und Mitarbeiter sowie E. K. NELSON<sup>2</sup> und Mitarbeiter haben für den Nachweis dieser Säuren die fraktionierte Destillation der Äthylester dieser Säuren empfohlen. Die einzelnen Säuren sollen dabei durch ihre Siedepunkte sowie ihre Hydrazide und ihre Benzylidenverbindungen gekennzeichnet werden. Dieses Nachweisverfahren erfordert große Substanzmengen.

c) **Nachweis von Salicylsäure neben Citronensäure.** Nach A. KLETT<sup>3</sup> werden 10 ccm der zu untersuchenden Lösung mit 4 Tropfen einer 10%igen Kalium- oder Natriumnitritlösung, 4 Tropfen Essigsäure und 1 Tropfen 10%iger Kupfersulfatlösung versetzt und das Gemisch zum Sieden erhitzt. Bei Gegenwart von Salicylsäure entsteht eine blutrote Färbung.

## B. Bestimmungen.

### 1. Bestimmung der flüchtigen Säuren.

Man destilliert die flüchtigen Säuren nach entsprechender Verdünnung mit Wasser ab oder leitet Wasserdampf in die mit kleiner Flamme erhitzte Flüssigkeit, so lange, wie das Destillat noch sauer reagiert. Wenn die Flüssigkeiten viel Alkohol enthalten, so kann man die Säuren zuerst mit Alkalilauge neutralisieren, den Alkohol vertreiben, darauf wieder mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure ansäuern und dann destillieren.

Von den hier in Betracht kommenden organischen Säuren sind Ameisen-, Essig- und Buttersäure mit Wasserdämpfen flüchtig; aber auch Benzoe-, Salicyl- und Zimtsäure und ferner sind die in den Fetten neben Buttersäure vorkommenden Capron- und Caprylsäure<sup>4</sup> mit Wasserdämpfen ebenfalls flüchtig, aber in Wasser nur schwer löslich. Um diese Säuren von den zuerst genannten in Wasser leicht löslichen Säuren zu trennen, schüttelt man das Destillat wiederholt mit Äther aus.

Die mit Äther ausgeschüttelte wäßrige Flüssigkeit wird zur Bestimmung der Gesamtmenge von Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure mit 0,1 N.-Alkalilauge unter Tüpfelung auf Azolithminpapier neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. In der einen Hälfte bestimmt man die Ameisensäure und in der anderen die Essig- und Buttersäure.

a) **Bestimmung der Ameisensäure.** Diese erfolgt nach dem Verfahren von H. FINCKE (S. 1077).

b) **Bestimmung der Essigsäure und der Buttersäure.** Die zweite Hälfte der Salzlösung wird eingengt und mit dem gleichen Volumen einer Lösung, die im Liter 90 g Kaliumbichromat und 400 g konz. Schwefelsäure enthält, 10 Minuten am Rückflußkühler erhitzt. Dadurch wird die vorhandene Ameisensäure zu Kohlensäure oxydiert. Die nicht veränderten anderen Säuren (Essigsäure und Buttersäure) destilliert man mit Wasserdampf über, wobei man Sorge trägt, daß das Volumen der zu destillierenden Flüssigkeit sich nicht zu sehr vermindert. Das Destillat wird mit 0,1 N.-Barytwasser genau neutralisiert, die Lösung der Bariumsalze eingengt, schließlich in eine Platinschale filtriert, eingedampft, bei 100° getrocknet und gewogen. Dann zerreibt man die trockenen Bariumsalze zu einem feinen Pulver und bestimmt ihren Bariumgehalt, indem man einen abgewogenen Teil in einem Platintiegel mit Schwefelsäure abraucht und das entstandene Bariumsulfat wägt. Wurden  $a$  Gramm des Bariumsalzgemisches angewendet und daraus  $b$  Gramm Bariumsulfat erhalten, so enthält die Bariumsalzmischung  $d = 607,63 \cdot \frac{b}{a} - 455,37\%$  Bariumacetat.

<sup>1</sup> H. FRANZEN u. Mitarbeiter: Zeitschr. physiol. Chem. 1921, 115, 9 u. 270; 1922, 122, 46 u. 263. — Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1922, 55, 2995.

<sup>2</sup> E. K. NELSON u. Mitarbeiter: Journ. Amer. Chem. Soc. 1927, 49, 1300; 1928, 50, 2012.

<sup>3</sup> A. KLETT: Pharm. Zentralh. 1900, 41, 452.

<sup>4</sup> Auch die höheren Fettsäuren sind, wenn auch nur in geringem Maße mit Wasserdämpfen flüchtig, aber in Wasser unlöslich; über ihre Bestimmung siehe Bd. IV.

Aus dem Verbrauch der Essig- und Buttersäuremischung an 0,1 N.-Barytwasser zur Neutralisation und dem Bariumgehalte des aus dem Säuregemische hergestellten Bariumsalzgemisches läßt sich der Gehalt der angewendeten Substanzmenge an freier Essigsäure ( $x$ ) und Buttersäure ( $y$ ) berechnen. Bedeutet  $c$  die ccm 0,1 N.-Barytwasser, die zur Neutralisation der Essigsäure und Buttersäure (also nach der Zerstörung der Ameisensäure durch die Chromsäuremischung) erforderlich waren,  $d$  die Prozente Bariumacetat in der Bariumsalzmischung (vorher berechnet), so enthält die angewendete Substanzmenge:

$$x = \frac{0,00272 \cdot d \cdot c}{36,51 + 0,088 \cdot d} \text{ g Essigsäure} \quad \text{und} \quad y = 1,18178 \cdot x \cdot \frac{100-d}{d} \text{ g Buttersäure.}$$

Nach einem anderen Vorschlage soll man die trockenen Bariumsalze mit absolutem Alkohol bei 30° behandeln; hierdurch wird das Bariumbutyrat gelöst, während das Bariumacetat ungelöst bleibt. Aus den so getrennten Salzen soll die Säure in beiden Fällen für sich nach Zusatz von Schwefelsäure wieder destilliert und titriert werden. Das erstere Verfahren ist aber wohl das zweckmäßigere.

Über ein weiteres Verfahren zur Bestimmung von Essigsäure und Buttersäure nebeneinander siehe unter 2.

K. R. HABERLAND<sup>1</sup> hat ein Verfahren zur Trennung der Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure vorgeschlagen, das z. T. auf der verschiedenen Löslichkeit der Blei- bzw. Zinksalze beruht; siehe S. 1155. Nach J. SCHÜTZ<sup>2</sup> ist das Verfahren jedoch zur Bestimmung der Säuren unbrauchbar, da der größte Teil der Säuren flüchtig ist.

## 2. Bestimmung der Essigsäure und Buttersäure nebeneinander nach G. WIEGNER<sup>3</sup>.

Bei der Destillation mit Wasserdampf gehen, wenn man vom Volumen einer wäßrigen Lösung die Hälfte abdestilliert, 36,59% der vorhandenen Essigsäure in das Destillat; es bleiben also 63,41% Essigsäure zurück. Von der Buttersäure destillieren 72,77% ab und 27,23% bleiben zurück. Bei der Untersuchung verfährt man folgendermaßen: Aus einem bestimmten Volumen der wäßrigen Lösung, dessen gesamte freie Säure zunächst nach einer Titration mit 0,05 N.-Kalilauge ermittelt wurde, destilliert man die Hälfte ab, und bestimmt im Destillat die Menge der flüchtigen Säuren mit 0,05 N.-Kalilauge. Darauf stellt man im Rückstand das ursprüngliche Volumen durch Verdünnung mit Wasser wieder her, destilliert wieder die Hälfte ab und titriert auch wieder das zweite Destillat. Zur Kontrolle wird dies auch ein drittes Mal wiederholt. Die drei Titrationen der Destillate lassen die Menge der ursprünglichen ungebundenen Essig- und Buttersäure berechnen. Die gesamten flüchtigen Säuren, also die gebundenen und freien Säuren, bestimmt man so, daß man Phosphorsäure oder Schwefelsäure zur Lösung hinzusetzt und dann ebenso wie vorher verfährt. Zur Destillation wird ein Kolben von etwa 500 ccm Inhalt verwandt, der mit einem Gummistopfen verschlossen ist, durch den ein kurzes weites Glasrohr geht, das direkt in den Kühler abgebogen ist. Der Kühler muß genügend wirksam sein. Es wird so lebhaft destilliert, daß sich keine Flüssigkeitstropfen an der Wand des Destillationskolbens ansetzen können, andererseits darf kein Überreißen von Flüssigkeitstropfen aus dem Destillationskolben in den Kühler eintreten.

Die Berechnung des Resultates geschieht nach den beiden Gleichungen

$$\begin{aligned} E &= 3,9620 (D_2 + D_3) - 1,3724 D_1 \\ B &= -1,9920 (D_2 + D_3) + 2,0641 D_1. \end{aligned}$$

Dabei bezeichnet  $E$  die ccm 0,05 N.-Essigsäure, die in der Lösung enthalten sind,  $B$  die ccm 0,05 N.-Buttersäure in der Lösung,  $D_1$  die ccm 0,05 N.-Säure

<sup>1</sup> K. R. HABERLAND: Zeitschr. analyt. Chem. 1899, **38**, 217.

<sup>2</sup> J. SCHÜTZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1900, **39**, 17.

<sup>3</sup> G. WIEGNER: Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1919, **10**, 156; vgl. auch Chem.-Ztg. 1923, **47**, 134; Zeitschr. angew. Chem. 1926, **39**, 1950. — Das Verfahren ist ursprünglich von E. DUCLAUX (Traité de Microbiologie Paris 1900, **3**, 385) ausgearbeitet worden.

im ersten Destillat,  $D_2$  die ccm 0,05 N.-Säure im zweiten Destillat und  $D_3$  die ccm 0,05 N.-Säure im dritten Destillat.

Um die etwas schwierige und zeitraubende Berechnung der nach dieser Methode ausgeführten Analysen zu ersparen, hat K. GNEIST ein Diagramm<sup>1</sup> ausgearbeitet, das erlaubt, ohne jegliche Berechnung die Säuren abzulesen.

W. STOLLENWERK<sup>2</sup> und K. GNEIST<sup>3</sup> haben die beiden Formeln von WIEGNER, wie folgt, abgeändert.

$$\begin{array}{l} \text{Nach W. STOLLENWERK} \\ \text{Nach K. GNEIST} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} E = 3,748 (D_2 + D_3) - 1,143 D_1 \\ B = -1,888 D_1 - 1,847 (D_2 + D_3) \\ E = 3,777 (D_2 + D_3) - 1,141 D_1 \\ B = -1,912 D_1 - 1,956 (D_2 + D_3). \end{array} \right.$$

Die Abweichungen dieser Gleichungen dürften auf die Verschiedenheiten der Destillationsapparaturen zurückzuführen sein.

Nach den Versuchen von J. GROSSFELD und F. BATTAY<sup>4</sup> ist die Methode besonders zur Bestimmung größerer Mengen Buttersäure neben Essigsäure geeignet; schwieriger dürfte es sein, sehr kleine Mengen Buttersäure damit noch richtig zu erfassen.

### 3. Bestimmung der flüchtigen Säuren durch Verteilung zwischen zwei Lösungsmitteln.

Mit Hilfe der Verteilungsmethode kann man 3, 4, 5 und mehr Säuren mit einer Genauigkeit von 1—2% nebeneinander bestimmen, was nach der Destillationsmethode so gut wie unmöglich ist.

a) Äther und Wasser nach W. U. BEHRENS<sup>5</sup>. Man schüttelt die wäßrige Lösung unter bestimmten Verhältnissen mit Äther aus und bestimmt den Säuregrad jeder einzelnen Fraktion durch Titration mit 0,05 N.-Natronlauge mit Phenolphthalein als Indicator. Die Titration des ätherischen Teiles ist durchaus scharf, wenn man etwa die gleiche Menge zusetzt und nach jedem Laugenzusatz gut umschüttelt. Der Versuchsäther wird vorher mit Natrium getrocknet. Unter dem Teilungsverhältnis einer Säure ist das Verhältnis der Konzentrationen der gesamten titrierbaren Säure (nicht des undissoziierten Teils) in Äther und Wasser verstanden. Die Teilungsverhältnisse der einzelnen Säuren sind — Konzentration in Molen angegeben — folgende:

|                             |                      |                               |                   |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------|
| Milchsäure . . . . .        | 0,0807 + 0,004 $C_w$ | i-Valeriansäure . . . . .     | 18,8 + 130 $C_w$  |
| Essigsäure (E) . . . . .    | 0,434                | n-Valeriansäure (V) . . . . . | 21,0 + 250 $C_w$  |
| Propionsäure (P) . . . . .  | 1,685 + 1 $C_w$      | n-Caprionsäure (C) . . . . .  | 81,5 + 1800 $C_w$ |
| n-Buttersäure (B) . . . . . | 5,85 + 23 $C_w$      |                               |                   |

$C_w$  bedeutet die Konzentration der Säure in der wäßrigen Phase, ausgedrückt in Molen je Liter.

Zur Ausführung der Analyse verwendet man 100 ccm-Gasmeßröhren mit Glashahn, deren anderes Ende mit einem Korkstopfen verschlossen wird. Zur Herstellung des Gleichgewichtes kehrt man die Röhre 20—30mal um und wartet einige Minuten, bis sich die Volumen nicht mehr ändern. Für die Titration läßt man einen aliquoten Teil durch den Glashahn ab.

<sup>1</sup> Eine genaue Berechnung zu diesem Diagramm findet sich in der Zeitschrift für die gesamte Fütterungslehre und Futtermittelkunde „Die Tierernährung“, Bd. 1, Heft 1, S. 65, Leipzig 1929. Ein Sonderdruck des Diagramms ist zu beziehen von der Akad. Verlagsges. m. b. H. Leipzig, Schloßgasse 9. Der Gebrauch dieses Diagramms ist sehr zu empfehlen, da es sehr zeitersparend ist und der Prozentgehalt an Säuren mit genügender Genauigkeit, bis zu hundertstel Prozent, abgelesen werden kann.

<sup>2</sup> W. STOLLENWERK: Wiss. Arch. Landwirtsch. Abt. A 1932, 8, 558; C. 1932, II, 463.

<sup>3</sup> K. GNEIST: Biedermanns Ztrbl. Agrik.-Chem. Abt. B. Tierernährung 1932, 4, 185; C. 1932, II, 463.

<sup>4</sup> J. GROSSFELD u. F. BATTAY: Z. 1931, 61, 129.

<sup>5</sup> W. U. BEHRENS: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 69, 97.

Berechnung der Ergebnisse bei Anwesenheit der normalen Säuren  $C_2-C_4$ . Es möge eine verdünnte wäßrige Lösung von Essigsäure ( $E$ ), Propionsäure ( $P$ ), n-Buttersäure ( $B$ ), n-Valeriansäure ( $V$ ) und Capronsäure ( $C$ ) vorliegen. Man stellt dann z. B. folgende 5 Fraktionen her:

$$\begin{array}{l} a = \left( \frac{40}{60} W \frac{40}{60} W \right) \quad \left| \quad c = \left( \frac{15}{85} A \frac{15}{85} W \right) \quad \left| \quad e = \left( \frac{4}{96} A \frac{4}{96} A \right) . \\ b = \left( \frac{40}{60} A \frac{40}{60} W \right) \quad \left| \quad d = \left( \frac{4}{96} A \frac{4}{96} W \right) \quad \left| \end{array}$$

Das erste Symbol hat folgende Bedeutung: Man verteilt einen aliquoten Teil der zu analysierenden Flüssigkeit zwischen 40 ccm Äther und 60 ccm Wasser  $\left(\frac{40}{60}\right)$ , läßt dann den wäßrigen Teil ( $W$ ) aus der Bürette ab und verteilt ihn in einer neuen Bürette wieder zwischen 40 ccm Äther und 60 ccm Wasser  $\left(\frac{40}{60}\right)$ . Die neue wäßrige Phase ( $W$ ) bildet die Fraktion  $a$  und wird titriert. Den ätherischen Teil aus der ersten Verteilung  $\left(\frac{40}{60} A\right)$  verteilt man wiederum zwischen 40 ccm Äther und 60 ccm Wasser, der wäßrige Teil bildet dann die Fraktion  $b$ . Für die Fraktion  $c$  muß man einen neuen aliquoten Teil der ursprünglichen Lösung benutzen. Legt man für  $E, P, B, V, C$  die Verteilungskoeffizienten 0,434, 1,685, 5,85, 21,0 und 81,5 zugrunde, so gelangt man zu folgenden Gleichungen:

$$\begin{array}{l} a = 0,6031 E + 0,2218 P + 0,0417 B + 0,0044 V + 0,0003 C \\ b = 0,1743 E + 0,2492 P + 0,1624 B + 0,0622 V + 0,0177 C \\ c = 0,0660 E + 0,1767 P + 0,2499 B + 0,1673 V + 0,0608 C \\ d = 0,0175 E + 0,0613 P + 0,1576 B + 0,2489 V + 0,1757 C \\ e = 0,0003 E + 0,0043 P + 0,0384 B + 0,2178 V + 0,5968 C \end{array}$$

Hieraus folgt

$$\begin{array}{l} E = 2,538 a - 4,010 b + 2,842 c - 1,081 d + 0,147 e \\ P = -2,685 a + 12,893 b - 10,736 c + 4,603 d - 0,643 e \\ B = 1,632 a - 11,099 b + 17,067 c - 10,092 d + 1,561 e \\ V = -0,659 a + 4,976 b - 10,292 c + 12,009 d - 2,635 e \\ C = 0,153 a - 1,193 b + 2,734 c - 3,765 d + 2,540 e \end{array}$$

Bei der Berechnung dieser Werte ist keine Rücksicht auf die Konzentrationsabhängigkeit genommen. Bei ihrer Berücksichtigung würden Veränderungen der Einzelwerte bis zu 1% erfolgen. Da die Umrechnung sehr umständlich ist und die Genauigkeit des Verfahrens nur 1% beträgt, wird wegen der Berechnung der Korrektur auf die Originalarbeit verwiesen. Zu berücksichtigen ist ferner, daß die Wasserphase nicht unbedeutliche Mengen Äther aufnimmt. Folgende Korrekturformeln sind zu berücksichtigen:

$$\begin{array}{l} \Delta W = 0,082 W - 0,009 A \\ \Delta A = 0,015 A - 0,097 W \end{array}$$

wo  $A$  das ursprüngliche Äther- und  $W$  das ursprüngliche Wasservolumen,  $\Delta W$  und  $\Delta A$  die Dilation bedeuten.

b) Isopropyläther und Wasser nach C. H. WERKMAN<sup>1</sup>. Isopropyläther hat gegenüber Äther die Vorteile des höheren Siedepunktes,

des niedrigeren Dampfdruckes bei 20° (158 mm), der geringeren Wärmeausdehnung, der geringeren Löslichkeit in Wasser (2,7% bei 23°) und der geringeren Löslichkeit von Wasser darin (0,4%), Eigenschaften, die praktisch auch beim

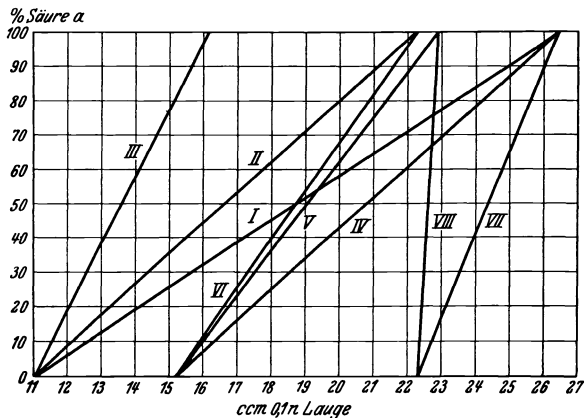


Abb. 10. Titrationswerte binärer Säuregemische nach C. H. WERKMAN.

<sup>1</sup> C. H. WERKMAN: Ind. Engin. chem. Analytical Edition 1930, 2, 302; nach J. SCHMIDT in G. KLEINs Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. 2, S. 408. Berlin: Julius Springer 1932.



käuflichen Produkt bestätigt gefunden wurden. WERKMAN hat eine praktische graphische Auswertung für die Analyse binärer Säuregemische (Abb. 10) angegeben, die jede Rechnung überflüssig macht.

Zur Ausführung dieser Methode bestimmt man in einer Probe die Gesamtsäure mit 0,1 N.-Kalilauge gegen Phenolphthalein. Dann werden 30 ccm der auf 0,1 N.-verdünnten Säurelösung mit 20 ccm Isopropyläther 3 Minuten im Scheidetrichter gut geschüttelt, nach einigen Minuten die wäßrige Phase abgezogen und davon 25 ccm ebenfalls mit 0,1 N.-Kalilauge titriert. Aus den verbrauchten ccm Lauge wird aus den Kurven direkt das Verhältnis der beiden Säuren abgelesen. Die nachstehende Tabelle gibt die zugrunde liegenden Verteilungswerte an.

Tabelle 8. Verteilungskoeffizienten (ccm verbrauchte 0,1 N.-Kalilauge).

| System                               | I           | II          | III           | IV           | V             | VI         | VII         | VIII          |                          |
|--------------------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------|---------------|------------|-------------|---------------|--------------------------|
| Säure a:                             | Buttersäure |             |               | Propionsäure |               |            | Milch-säure | Ameisen-säure |                          |
| Säure b:<br>% Säure a<br>(ccm 0,1 n) | Milch-säure | Essig-säure | Propion-säure | Milch-säure  | Ameisen-säure | Essigsäure |             |               | % Säure b<br>(ccm 0,1 n) |
| 100                                  | 11,05       | 11,05       | 11,5          | 16,2         | 16,2          | 16,2       | 24,4        | 22,8          | 0                        |
| 90                                   | 12,35       | 12,2        | 11,6          | 17,0         | 16,9          | 16,8       | 24,2        | —             | 10                       |
| 80                                   | 13,7        | 13,3        | 12,1          | 17,8         | 17,6          | 17,4       | 24,0        | 22,7          | 20                       |
| 70                                   | 15,1        | 14,3        | 12,6          | 18,6         | 18,25         | 18,1       | 23,85       | —             | 30                       |
| 60                                   | 16,4        | 15,6        | 13,1          | 19,5         | 18,9          | 18,7       | 23,6        | —             | 40                       |
| 50                                   | 17,7        | 16,75       | 13,7          | 20,4         | 19,55         | 19,3       | 23,4        | 22,5          | 50                       |
| 40                                   | 19,1        | 17,8        | 14,1          | 21,2         | 20,2          | 19,9       | 23,2        | —             | 60                       |
| 30                                   | 20,4        | 19,0        | 14,6          | 22,0         | 20,9          | 20,5       | 23,0        | —             | 70                       |
| 20                                   | 21,7        | 20,1        | 15,2          | 22,8         | 21,5          | 21,1       | 22,8        | 22,4          | 80                       |
| 10                                   | 23,1        | 21,2        | 15,65         | 23,6         | 22,2          | 21,7       | 22,6        | —             | 90                       |
| 1                                    | 24,4        | 22,3        | 16,2          | 24,4         | 22,8          | 22,3       | 22,35       | 22,3          | 100                      |

#### 4. Bestimmung von Ameisensäure und Essigsäure.

Nach B. FUCHS<sup>1</sup> bestimmt man zunächst in einem 100 ccm-Meßkolben die Gesamtsäure (Ameisen- + Essigsäure), indem man nach Zusatz von Phenolphthalein bis nahe an den Umschlag N.-Natronlauge hinzufügt, dann zur Entfernung der Kohlensäure aufkocht und schließlich mit einigen Tropfen N.-Natronlauge die Titration beendet. Etwa vorhandener Acetaldehyd wird bei dieser Behandlung sogleich entfernt. Tritt beim Kochen der fast neutralisierten Lösung Rosafärbung ein, so ist schon zu viel Natronlauge zugesetzt worden, und der Endpunkt muß nach Zusatz einer kleinen Menge Säure nochmals genau eingestellt werden. Der Verbrauch an N.-Natronlauge für die Gesamtsäure sei N ccm. Zu der neutralisierten Lösung fügt man nun festes reines Natriumacetat, fast gesättigte Mercurichloridlösung in reichlichem Überschuß und gegebenenfalls soviel Wasser hinzu, daß der Kolben  $\frac{3}{4}$  gefüllt ist. Hierauf wird erhitzt und nach Beendigung der Hauptreaktion 15 Minuten mit kleiner Flamme bis nahe unter dem Siedepunkt gehalten. Nach Abkühlung wird aufgefüllt und in 50 ccm Filtrat die nach der Gleichung:



<sup>1</sup> B. FUCHS: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, 78, 125. Andere Methoden zur Bestimmung der Ameisensäure in Essigsäure siehe: H. OST u. F. KLEIN: Chem.-Ztg. 1908, 32, 815. — M. WEGENER: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 427. — H. FINCKE: Apoth.-Ztg. 1910, 25, 727. — D. S. MACNAIR: Zeitschr. analyt. Chem. 1888, 27, 398. — E. MERCK: Prüfung der chemischen Reagenzien auf Reinheit, 4. Aufl., S. 115, 1931.

gebildete Salzsäure (die hier als Essigsäure vorliegt) mit N.-Natronlauge titriert. Als Indicator dient der Überschuß von Mercurichlorid (Hellgelbfärbung durch Alkali; weiße Porzellanschale als Titriergefäß). Ist der Verbrauch an N.-Natronlauge (auf die Gesamtmenge von 100 ccm Filtrat bezogen) gleich  $n$  ccm, so sind vorhanden gewesen an Ameisensäure:  $n \times 0,04602$  g, an Essigsäure:  $(N - n) \times 0,06030$  g.

Bei dem Schnellverfahren nach FUCHS kann man nach R. G. C. OLDEMAN<sup>1</sup> gegen Phenolphthalein mit 0,1 N.-Natronlauge titrieren und dadurch die Genauigkeit bedeutend, bis auf etwa  $\pm 0,2$  mg Ameisensäure, steigern, wenn durch Zusatz von Natriumchlorid der Überschuß an Quecksilberchlorid komplex gebunden wird.

### 5. Bestimmung von Bernstein-, Äpfel-, Wein- und Citronensäure.

Zur Bestimmung dieser hauptsächlich in Früchten und Weinen vorkommenden Säuren sind zahlreiche Verfahren vorgeschlagen worden, namentlich zur Bestimmung der Bernsteinsäure. Die auf diese letztere bezüglichen Verfahren kann man in folgende Gruppen einteilen:

1. Extraktionsverfahren, nach denen die Bernsteinsäure mit Äther oder Alkohol extrahiert wird und dann in Form eines Salzes, vorwiegend als Silber- oder Calciumsalz, bestimmt wird. Die Verfahren sind aber deshalb nicht genau, weil die drei letztgenannten Fruchtsäuren auch in Äther und Alkohol löslich sind. (Verfahren von L. PASTEUR<sup>2</sup>, CH. GIRARD<sup>3</sup>, J. LABORDE und L. MOREAU<sup>4</sup> und anderen.)

2. Fällungsverfahren, nach denen die Bernsteinsäure in Form eines unlöslichen Salzes zunächst mit den anderen Säuren gefällt wird, und nach Entfernung dieser Säuren in Form eines Salzes isoliert wird; als Fällungsmittel dienen hauptsächlich die Calcium-, Barium-, Blei- und Eisensalze. (Verfahren von J. MACAGNO<sup>5</sup>, R. KAYSER<sup>6</sup>, C. SCHMITT und C. HIEPE<sup>7</sup>, G. JÖRGENSEN<sup>8</sup>, J. M. ALBAHARI<sup>9</sup>, J. BORDAS, JOULIN und v. RACZKOWSKI<sup>10</sup>).

3. Oxydationsverfahren, die darauf beruhen, daß Bernsteinsäure von allen in Betracht kommenden Säuren allein eine gewisse Beständigkeit gegen Kaliumpermanganatlösung besitzt. Nach vollzogener Oxydation wird die Bernsteinsäure ausgezogen oder gefällt. Dieses bis jetzt zuverlässigste Verfahren ist zuerst von R. KUNZ angegeben und von C. VON DER HEIDE und H. STEINER verbessert worden. Neuerdings haben R. NUCCORINI und A. ZACCAGNINI das Fällungsverfahren nach G. JÖRGENSEN<sup>7</sup> und das Oxydationsverfahren nach C. VON DER HEIDE und H. STEINER zu einem neuen Verfahren ausgearbeitet.

a) Verfahren von R. KUNZ<sup>11</sup> bzw. von DER HEIDE und H. STEINER<sup>12</sup>. C. VON DER HEIDE und H. STEINER halten das KUNZsche Oxydationsverfahren nach ihren Verbesserungen für richtiger als die Fällungsverfahren und bestimmen, nachdem sie in beiden Fällen vorher die Weinsäure abgeschieden haben, 1. die Bernsteinsäure durch Ausziehen des oxydierten Rückstandes mit Äther, 2. die Bernsteinsäure + Äpfelsäure zusammen und berechnen die letztere aus der Differenz.

Das Verfahren setzt sich aus folgenden Einzelbehandlungen zusammen: 1. Entfernung der Weinsäure als Weinstein, 2. Ausziehen der Äpfelsäure zusammen mit der Bernsteinsäure durch Äther, 3. Bestimmung der Äpfel- und Bernsteinsäure aus der Alkalität der Asche ihrer Alkalisalze.

<sup>1</sup> R. G. C. OLDEMAN: Pharm. Weekbl. 1931, 68, 379; C. 1931, II, 3642.

<sup>2</sup> L. PASTEUR: Ann. chim. phys. 1860, [3] 58, 330; Zeitschr. analyt. Chem. 1864, 3, 156.

<sup>3</sup> CH. GIRARD: Docum. sur les Falsifications des matières alimentaires ect. du Laboratoire municipal 1885, 2.

<sup>4</sup> J. LABORDE u. L. MOREAU: Ann. Inst. Pasteur 1899, 13, 657; C. 1899, II, 794.

<sup>5</sup> J. MACAGNO: Zeitschr. analyt. Chem. 1875, 14, 203.

<sup>6</sup> R. KAYSER: Rep. analyt. Chem. 1881, 1, 209.

<sup>7</sup> C. SCHMITT u. C. HIEPE: Zeitschr. analyt. Chem. 1882, 21, 529.

<sup>8</sup> G. JÖRGENSEN: Z. 1907, 13, 241; 1909, 17, 396.

<sup>9</sup> J. M. ALBAHARI: Compt. rend. Paris 1907, 144, 1232.

<sup>10</sup> J. BORDAS, JOULIN u. v. RACZKOWSKI: Journ. Pharm. et. Chim. 1898, [6] 7, 407.

<sup>11</sup> R. KUNZ: Z. 1903, 6, 723.

<sup>12</sup> C. VON DER HEIDE u. H. STEINER: Z. 1909, 17, 291 u. 307. — Hier ist auch die Literatur über die Bestimmungsverfahren der Bernsteinsäure und Äpfelsäure zusammengestellt.

Die Verfahren gestalten sich, wie folgt:

α) Bestimmung der Bernsteinsäure. 50 ccm der Lösung, deren Säuregehalt 1% nicht übersteigt, werden mit 1 ccm 10%iger Bariumchloridlösung versetzt und darauf wird nach Zusatz von 1 Tropfen alkoholischer Phenolphthaleinlösung feingepulvertes Bariumhydroxyd in kleinen Anteilen bis zur eintretenden Rotfärbung hinzugefügt. Während dieser Behandlung wird möglichst genau auf 20 ccm eingengt. Ist ein zu großer Bariumüberschuß zugesetzt worden, so entfernt man ihn vor dem Alkoholzusatz dadurch, daß man Kohlen-

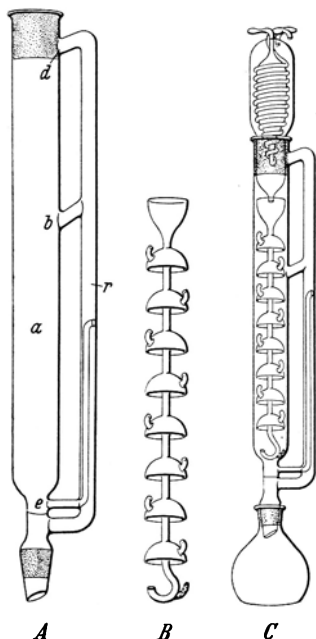


Abb. 11. Perforationsapparat nach C. VON DER HEIDE. A Hauptteil, B Einsatz, C ganzer Apparat.

säure auf die Flüssigkeitsoberfläche unter gleichzeitigem Rühren der Flüssigkeit strömen läßt. Nach dem Erkalten werden unter häufigem Umrühren 85 ccm Alkohol (96%) hinzugegeben. Nach mindestens zweistündigem Stehen wird der Niederschlag abfiltriert, einige Male mit Alkohol (80%) ausgewaschen und der gesamte Niederschlag mit heißem Wasser von dem Filter in dieselbe Schale zurückgespritzt. Der Schaleninhalt wird zur vollständigen Entfernung des Alkohols auf dem siedenden Wasserbade eingengt und alsdann unter gleichzeitigem weiteren Erhitzen mit je 3—5 ccm Kaliumpermanganatlösung (5%) so lange versetzt, bis die rote Farbe 5 Minuten bestehen bleibt. Man gibt dann nochmals 5 ccm Kaliumpermanganatlösung hinzu und läßt weitere 15 Minuten einwirken. Bei etwaigem abermaligen Verschwinden der Rotfärbung ist diese Behandlung zu wiederholen. Den Überschuß an Kaliumpermanganat zerstört man durch Schweflige Säure. Nach dem Verschwinden der Rotfärbung säuert man vorsichtig mit Schwefelsäure (25%) an und fährt dann fort Schweflige Säure zuzusetzen, bis auch das Mangansuperoxyd gelöst ist. Alsdann dampft man auf etwa 30 ccm ein, führt die Flüssigkeit mitsamt dem vorhandenen Niederschlag von Bariumsulfat in den Perforations-

apparat (Abb. 11) über, indem man durch Zusatz von Schwefelsäure (40%) dafür sorgt, daß die Flüssigkeit etwa 10% freie Schwefelsäure enthält.

Der Hauptteil (Abb. 11 A) des Perforationsapparates nach C. VON DER HEIDE<sup>1</sup> besteht aus dem Rohr *a*, das bis zum Ansatzrohr *b* etwa 100 ccm fast. Bei *e* befindet sich ein zweites, engeres Ansatzrohr, das in das Rohr *r* mündet und in diesem eine angemessene Strecke emporgeführt ist. Die Öffnung *d* in dem Schliffe korrespondiert mit einer Öffnung in dem Schliffteile des Kühlers. Ein wesentlicher Teil des ganzen Apparates (C) ist der Einsatz B. Er besteht aus einer unten umgebogenen, oben zu einem Trichterchen erweiterten Glasröhre, an der eine Anzahl Tellerchen angeschmolzen ist, die hakenförmig gekrümmte kleine Ansätze zur Führung der Perforationsflüssigkeit tragen.

a) Für die Ätherperforation werden in den Hauptteil A 3—4 ccm Quecksilber gefüllt, um das Ansatzrohr *e* zu versperren. Hierauf füllt man in *a* die zu perforierende Flüssigkeit und setzt den Einsatz B so ein, daß das Trichterchen sich oben befindet (wie bei C). Hierauf wird der Kühler so auf den Schliff des Hauptteils A gesetzt, daß dessen Öffnung *d* mit der Öffnung im Kühlerschliff korrespondiert. Nachdem nun noch das mit Äther gefüllte Siedegefaß unten an den Hauptteil A gesetzt worden ist, beginnt man mit dem Erhitzen. Der Ätherdampf steigt in *r* in die Höhe, gelangt durch die Öffnung *d* in den Kühler, wird dort kondensiert, fällt in das Trichterchen des Einsatzes B und gelangt an dem umgebogenen Ende von B in die zu perforierende Flüssigkeit. Durch die Tellerchen, die dem Äther in den Weg gestellt sind, wird er zu langsamem Aufsteigen gezwungen. Endlich läuft der Äther durch das Ansatzrohr *b* in den Extraktionskolben zurück, so daß der Kreislauf von neuem beginnen kann.

<sup>1</sup> C. VON DER HEIDE: Z. 1909, 17, 315.

b) Für die Chloroformperforation gießt man in den Hauptteil von *A* zunächst etwa 30—50 ccm Chloroform und setzt dann erst den Einsatz ein, jedoch so, daß das Trichterchen sich unten befindet, also in das Chloroform eintaucht. Hierauf gießt man vorsichtig auf das Chloroform die zu perforierende Flüssigkeit, setzt den Kühler in obiger Weise ein und beginnt, das mit Chloroform teilweise gefüllte Kölbchen zu erhitzen. Der Chloroformdampf steigt in *r* in die Höhe, gelangt bei *d* in den Kühler, wird hier kondensiert und fällt auf die Tellerchen des Einsatzes, wodurch ein langsames Durchrieseln der zu perforierenden Flüssigkeit gewährleistet wird. Unten sammelt sich das Chloroform und wird schließlich nach dem Gesetz der kommunizierenden Röhren durch das Ansatzrohr *e* in das Rohr *r* befördert, von wo es in das Siedegefaß zurückfließt.

Für die Perforation nur mit Äther hat C. VON DER HEIDE einen etwas einfacheren Apparat eingerichtet, der dem Apparat von W. PIP<sup>1</sup> nachgebildet ist.

Nach 9 Stunden kann in den meisten Fällen die Perforation als beendet angesehen werden; nach 12 Stunden ist mit Sicherheit die Bernsteinsäure quantitativ in den Äther übergegangen. Der Kolbeninhalt wird mit Hilfe von etwa 20 ccm Wasser in ein Becherglas übergeführt, worauf man den Äther unter Vermeiden des Siedens am besten durch Stehenlassen an einem warmen Ort verdunstet.

Unter Verwendung von Phenolphthalein neutralisiert man hierauf mit einer völlig halogenfreien 0,1 N.-Lauge, führt den Inhalt des Becherglases in ein 100 ccm-Meßkölbchen über, versetzt mit 20 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung und füllt unter tüchtigem Umschütteln bis zur Marke auf. Man filtriert vom ausgefallenen Silbersuccinat ab, bringt 50 ccm des Filtrats in ein Becherglas und titriert nach Zusatz von Salpetersäure und Eisenammoniumalaunlösung mit 0,1 N.-Rhodanammiumlösung das überschüssige Silbersalz zurück.

Hat man 50 ccm Lösung verarbeitet, zur Titration der mit Äther ausgezogenen Säuren 20 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung vorgelegt und zur Rücktitration von 50 ccm Filtrat *x* ccm 0,1 N.-Rhodanammiumlösung verbraucht, so sind in 100 ccm Lösung  $y = 0,0236 a$  Gramm Bernsteinsäure enthalten, wobei  $a = 10 - x$  ist.

β) Bestimmung von Bernsteinsäure + Äpfelsäure. Man setzt zu 50 ccm Lösung 1 ccm Eisessig, 0,25 ccm Kaliumacetatlösung (20%), 7,5 g gepulvertes reines Kaliumchlorid, das man durch Umrühren nach Möglichkeit in Lösung bringt, und fügt dann noch 7,5 ccm Alkohol (95 Vol.-%) hinzu. Nachdem man durch starkes, etwa 1 Minute anhaltendes Reiben des Glasstabes an der Wand des Becherglases die Abscheidung des Weinsteines eingeleitet hat, läßt man die Mischung wenigstens 15 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, filtriert ab und wäscht den Niederschlag mit einem Gemisch von 15 g Kaliumchlorid, 20 ccm Alkohol (95 Vol.-%) und 100 ccm Wasser. Das Becherglas wird etwa dreimal mit wenigen ccm dieser Lösung abgespült, wobei man jedesmal gut abtropfen läßt. Sodann werden Filter und Niederschlag durch etwa dreimaliges Abspülen und Aufgießen von einigen ccm der Waschflüssigkeit ausgewaschen, von der im ganzen nicht mehr als 10 ccm gebraucht werden dürfen. — Das Filtrat wird zur Beseitigung des Alkohols und der Essigsäure auf wenige ccm eingengt. Die sich hierbei bildenden Krystallkrusten müssen wiederholt mit Hilfe eines Pistills zerdrückt werden. Man nimmt den Rückstand mit wenig Wasser auf, versetzt mit 5 ccm Bariumchloridlösung (10%) und mit so viel fein gepulvertem Bariumhydroxyd, unter Verwendung eines Tropfen Phenolphthaleins als Indicator, bis bleibende Rotfärbung die alkalische Reaktion anzeigt. Zu der auf genau 20 ccm eingengten Flüssigkeit werden nach dem Erkalten unter Umrühren 85 ccm Alkohol (96 Vol.-%) gegeben. Nach mindestens zweistündigem Stehen wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und sorgfältig mit Alkohol (80%) ausgewaschen. Alsdann wird der Niederschlag mit heißem Wasser vom Filter in die Schale zurückgespritzt und

<sup>1</sup> W. PIP: Zeitschr. angew. Chem. 1903, 16, 657; Chem.-Ztg. 1903, 27, 706.

auf dem Wasserbade fast bis zur Trockne eingedampft. Nachdem man hierauf den gerade noch feuchten Rückstand mit  $2\frac{1}{2}$ —3 ccm Schwefelsäure (40%) versetzt hat, gibt man so lange fein gepulvertes wasserfreies Natriumsulfat hinzu, bis das Gemisch ein lockeres trockenes Pulver ist, und zieht 6 Stunden mit Äther im SOXLETH-Apparat aus. Der ätherischen Säurelösung setzt man 10—20 ccm Wasser hinzu und läßt den Äther verdunsten. Die wäßrige Flüssigkeit wird mit Lauge von bekanntem Titer gegen Phenolphthalein genau neutralisiert. Man dampft die Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne und verascht. Die schließlich erhaltenen Carbonate werden mit einer gemessenen Menge 0,1 N.-Salzsäure im Überschuß versetzt, auf dem Wasserbade kurze Zeit erhitzt und der Überschuß an Salzsäure mit 0,1 N.-Lauge zurückgemessen.

Wurden bei Verwendung von 50 ccm Lösung  $b_1$  ccm 0,1 N.-Salzsäure vorgelegt und zur Neutralisation  $c_1$  ccm 0,1 N.-Lauge verbraucht, so erforderten die Carbonate aus 50 ccm Lösung  $a_1 = (b_1 - c_1)$  ccm 0,1 N.-Salzsäure zur Neutralisation. Hat man ferner gefunden, daß 100 ccm Lösung  $y$  g Bernsteinsäure enthalten, so würden die Alkalisalze dieser Säuremenge nach dem Veraschen zur Neutralisation  $z = \frac{1000 y}{5,9}$  0,1 N.-Salzsäure verbrauchen,

die Asche des Alkalimalats aus 100 ccm erfordert mithin  $\left(2 a_1 - \frac{1000 y}{5,9}\right)$  ccm 0,1 N.-Salzsäure; diese Säuremenge entspricht:

$$x = \left(2 a_1 - \frac{1000 y}{5,9}\right) \cdot \frac{6,7}{1000} = (0,0134 a_1 - 1,1373 y) \text{ Gramm Äpfelsäure.}$$

Bequemer ist folgende Berechnung: Haben die Zahlen  $a_1 = (b_1 - c_1)$  dieselbe Bedeutung, wie oben angegeben, und die Zahl  $a = (10 - c)$  die auf S. 1163 angegebene, auf die Bernsteinsäure bezügliche Bedeutung, so ist

$$x = (a_1 - 2a) \cdot 0,0134.$$

**b) Bestimmung von Bernstein-, Äpfel-, Wein- und Citronensäure nach R. NUCCORINI und A. ZACCAGNINI<sup>1</sup>.** Das Verfahren ist zur Trennung der Säuren bei der chemischen Untersuchung von Früchten ausgearbeitet. Die Lösung der Säuren wird auf etwa 30 ccm eingeengt, mit Kalilauge gegen Lackmus neutralisiert, wiederum eingeengt, und zwar auf 10 ccm, mit 3 ccm Eisessig und mit Alkohol versetzt, bis die Lösung 80% Alkohol enthält. Unter zeitweisem Umrühren läßt man 2 Tage stehen. Der ausgefällte Weinstein wird abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen; Filter samt Niederschlag titriert man mit 0,1 N.-Natronlauge gegen Phenolphthalein.

Das Filtrat vom Weinstein wird auf dem Wasserbade eingeengt, bis sich Alkohol und Essigsäure verflüchtigt haben. Darauf neutralisiert man mit Natronlauge, führt in einen 250 ccm-Kolben über, versetzt mit Bariumchlorid und füllt zur Marke auf.

Zur Bestimmung der Bernsteinsäure engt man einen aliquoten Teil der klaren Lösung auf etwa 20 ccm ein, versetzt mit soviel Alkohol, daß der Gehalt der Lösung an diesem 80% beträgt. Nach 12 Stunden filtriert man vom Niederschlag ab. Nach dem Auswaschen mit Alkohol (80%) spritzt man den Niederschlag in ein Becherglas, verjagt den Alkohol und behandelt dann mit Kaliumpermanganatlösung (5%) zur Oxydation von Bariummalat und -citrat in kleinen Portionen (3—5 ccm), bis die Rötung 5 Minuten bestehen bleibt, und gibt nochmals 5 ccm Permanganatlösung hinzu; bleibt jetzt die rote Farbe 20 Minuten bestehen, so ist die Oxydation beendet. Mittels Schwefliger Säure entfernt man den Überschuß an Kaliumpermanganat. Man säuert mit Schwefelsäure an, leitet nochmals Schweflige Säure ein und dampft auf 30 ccm ein. Dann gibt man Schwefelsäure (40%) so lange hinzu, bis die Lösung 10% Schwefelsäure enthält. Die Mischung (Niederschlag und Flüssigkeit) wird 12 Stunden

<sup>1</sup> R. NUCCORINI u. A. ZACCAGNINI: Ann. sper. agrar. Ital. 1930, 4, 281, 301; Zeitschr. analyt. Chem. 1932, 87, 151.

mit Äther perforiert (S. 1162). Nach dem Verjagen des Äthers neutralisiert man mit Natronlauge gegen Phenolphthalein, spült in einen 100 ccm-Kolben, versetzt mit 20 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung, füllt auf und titriert 50 ccm des Filtrates nach VOLHARD. Hieraus ergibt sich der Gehalt an Bernsteinsäure.

Zur Bestimmung der Äpfel- und Citronensäure wird der größere Teil der Lösung der Bariumsalze in einem 100 ccm-Meßkolben auf 70 ccm aufgefüllt und bis zur Marke mit Alkohol (94%) versetzt. Bei diesem Verfahren fallen Bariumsuccinat und Bariumcitrat aus, während Bariummalat in Lösung bleibt. Der Niederschlag wird in Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und das Barium durch Schwefelsäure ausgefällt. Die vorher ermittelte Bernsteinsäure rechnet man auf Bariumsulfat um, zieht diesen Wert von dem Gesamt-Bariumsulfatrückstand ab und berechnet die Differenz auf Citronensäure.

Das Bariummalat enthaltende Filtrat wird mit den übrigen Filtraten auf 10 ccm eingeeengt und mit soviel Alkohol versetzt, daß der Gehalt der Lösung daran 80% beträgt. Man läßt über Nacht stehen, filtriert den Niederschlag ab, löst ihn in Wasser auf, säuert mit Salzsäure an und fällt das Barium als Sulfat. Das Ergebnis wird auf Äpfelsäure berechnet.

c) Bestimmung von Äpfelsäure und Citronensäure nach C. F. MUTTELET<sup>1</sup> in der Abänderung von C. ESPESO<sup>2</sup>. Das Verfahren beruht auf der Fällung beider Säuren durch Bariumbromid und ihrer Trennung auf Grund der verschiedenen Löslichkeit der Bariumsalze in verd. Alkohol. Die Lösung der Säuren, die etwa 5—6 ccm N.-Natriumcarbonatlösung entspricht, wird gegen Phenolphthalein neutralisiert und mit 25—30 ccm einer Lösung von Bariumbromid in 80%igem Alkohol versetzt. Der sich bildende Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, mit Alkohol (80%) gewaschen und dann in möglichst wenig verd. Salzsäure gelöst; die Lösung wird auf etwa 100 ccm aufgefüllt und mit Natronlauge neutralisiert. Nach dem Auffüllen auf 125 ccm wird zu der Lösung unter Umschwenken in kleinen Mengen das halbe Volumen 95%igen Alkohols hinzugegeben. Nach einigen Stunden wird der Niederschlag auf einem Filter gesammelt und mit verd. Alkohol (1:3) gewaschen, wobei sich häufig noch ein Niederschlag absetzt, da oft noch 20—30 mg Citronensäure anfangs in Lösung bleiben. Der zweite Niederschlag wird ebenso gesammelt und gewaschen, wobei man stets auf einen etwaigen Gehalt an Bariummalat mikrochemisch prüft. Die von beiden Niederschlägen erhaltenen Filtrate werden auf 25 ccm eingedampft und mit dem doppelten Volumen Alkohol (75%) versetzt. Der sich dann ausscheidende Niederschlag des Bariummalats wird wieder auf einem Filter gesammelt und mit Alkohol (80%) gewaschen. Aus den aus den Niederschlägen erhaltenen Mengen Barium werden die vorhandenen Mengen von Citronensäure und Äpfelsäure berechnet. Nach den Versuchen ESPESOS schwankt der Fehler zwischen —7 bis +20 mg.

d) Bestimmung von Oxal-, Bernstein-, Äpfel-, Wein- und Citronensäure. Nach J. M. ALBAHARY<sup>3</sup> wird die zu untersuchende Substanz zunächst mit der gleichen Menge neutralem Alkohol (90%), sodann mit angesäuertem Alkohol (1% Salzsäure) ausgezogen. Die vereinigten Filtrate werden mit Ammoniak neutralisiert, der Alkohol abdestilliert und der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit einer Lösung von Bleiacetat ausgefällt. Den Niederschlag zieht man 1 Stunde mit verd. Essigsäure bei 70° aus. Bleimalat geht in Lösung und wird nach dem Neutralisieren und Fällen mit Alkohol entweder als Calciumsalz oder durch Titration bestimmt. Der in verd. Essigsäure unlösliche Rückstand kann aus den Bleisalzen der Oxal-, Bernstein-, Wein- und Citronensäure

<sup>1</sup> C. F. MUTTELET: Ann. Falsif. 1922, 15, 192.

<sup>2</sup> C. ESPESO: Ann. Falsif. 1928, 21, 20; Zeitschr. analyt. Chem. 1928, 75, 474.

<sup>3</sup> J. M. ALBAHARY: Ann. Falsif. 1912, 5, 147; C. 1912, I, 1502.

bestehen. Die wäßrige Lösung wird mit Schwefelwasserstoff entbleit und das Filtrat auf dem Wasserbade stark eingengt. Darauf versetzt man mit Kaliumacetat und mit mehr als 2 Volumen Alkohol (95%). Man filtriert vom ausgefallenen Kaliumtartrat ab und wägt dieses nach dem Trocknen. Das Filtrat wird mit Essigsäure angesäuert, mit Calciumchlorid versetzt und 24 Stunden lauwarm stehen gelassen. Ein sich etwa ausscheidender Niederschlag von Calciumoxalat wird entweder gewichtsanalytisch oder maßanalytisch mit Kaliumpermanganat bestimmt. Das Filtrat kann noch Bernsteinsäure und Citronensäure enthalten. Zu ihrer Bestimmung teilt man die Lösung in zwei Teile. Die eine Hälfte wird mit Eisenchlorid versetzt; ist Bernsteinsäure zugegen, so fällt sie quantitativ als basisches Eisensuccinat  $\text{Fe}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_4$  aus. Der zweite Teil der Lösung wird stark konzentriert, mit der dreifachen Menge Alkohol versetzt, und mit Bariumacetat gefällt. Der sich bildende Niederschlag von Bariumsuccinat und -citrat wird abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, getrocknet und gewogen.

e) **Potentiometrische Bestimmung der Bernstein-, Äpfel- und Weinsäure nebeneinander nach P. DUROI und M. DUBOUX<sup>1</sup>.** Diese fällungsanalytische Methode beruht darauf, daß die Ionen der genannten drei Säuren durch Lanthannitrat aus neutralisierter alkoholischer Lösung vollständig ausgefällt werden können, daß also bei fraktioniertem Zusatz des Reagens zu einer Lösung von hinreichender Alkoholstärke der Knickpunkt der Leitfähigkeitskurve der Summe der drei Bestandteile entsprechen muß.

Der Knickpunkt tritt jedoch schon etwas früher auf, entsprechend einem Minderverbrauch des Fällungsmittels bis zu 8% der theoretischen Menge. Dieser Fehler läßt sich jedoch durch einen empirischen Titer beheben, wie er durch Einstellung auf eine Tartrat- oder Malatlösung von bekanntem Gehalt mittels Leitfähigkeitstitrationen festgestellt wird. Das Verfahren ist für die Säureverhältnisse des Weines ausgearbeitet worden. Durch Leitfähigkeitstitrierung mittels Lanthannitratlösung wird in einem Teil der Lösung zunächst die Summe von Weinsäure, Äpfelsäure und Bernsteinsäure ermittelt, wenn die Alkoholstärke 50% beträgt. In einem anderen Teil der Lösung, deren Alkoholstärke auf 66% gebracht ist, wird die Summe von Weinsäure und Äpfelsäure bestimmt. Die Differenz gegen das Ergebnis des vorhergehenden Versuches entspricht dann dem Bernsteinsäuregehalt. Enthält die Flüssigkeit mehr als 8 g Äpfelsäure und 4–5 g Weinsäure im Liter, so ist diese Bestimmung nicht genau. Endlich läßt sich noch die Weinsäure allein durch Leitfähigkeitstitrierung mittels Bariumacetatlösung bei Gegenwart von 85% Alkohol und 5% Eisessig bestimmen; doch erhält man nur dann richtige Ergebnisse, wenn auf 1 Äquivalent Äpfelsäure wenigstens 3,7 Äquivalente Weinsäure zugegen sind. Im anderen Falle muß man eine entsprechende Menge Weinsäure zusetzen und nachher von der durch Titrierung gefundenen Menge wieder abziehen. Der Äpfelsäuregehalt ergibt sich endlich als Differenz aus den beiden Versuchsreihen.

Auf diesen Grundlagen baut sich die folgende Arbeitsvorschrift auf:

Erforderliche Lösungen.

1. 0,1 N.-Essigsäure, 2. 50%iger Alkohol (Lösung A), 3. 80%iger Alkohol (Lösung B).
4. 0,5 N.-Natriumtartratlösung. 50 ccm N.-Weinsäurelösung werden kochend heiß genau mit Natronlauge neutralisiert und nach dem Erkalten auf 100 ccm aufgefüllt.
5. Etwa 0,5 N.-Lösung von Lanthannitrat. 7,2 g kryst. Salz,  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 + 6 \text{H}_2\text{O}$ , werden in wenig Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Man bestimmt die Normalität dieser Lösung, indem man mittels ihrer eine Leitfähigkeitstitrierung an 1 ccm 0,5 N.-Natriumtartratlösung ausführt, die zuvor mittels einer Mischung gleicher Teile Wasser und Alkohol auf 50 ccm verdünnt wurde. War das Lanthannitrat rein, so liegt die Normalität bei 0,54.
6. Bariumacetatlösung. Man fügt allmählich zu 60 g kryst. Bariumhydroxyd verd. Essigsäure bis zur vollständigen Auflösung und bringt mit Wasser auf 500 ccm. Der Bariumionengehalt kann durch Gewichtsanalyse oder durch Leitfähigkeitstitrierung bestimmt werden. Der Titer liegt am besten zwischen einer 0,7 und 1 N.-Lösung.

<sup>1</sup> P. DUROI u. M. DUBOUX: Bull. Soc. chim. France 1913, 13, 832; Zeitschr. analyt. Chem. 1913, 52, 244; 1915, 54, 575. — Vgl. auch Mitt. Lebensmittelunters. Hygiene 1913 4, 229 u. 237.

Die Leitfähigkeitstitrierung, bei welcher die Ermittlung der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit als Indicator für den Ablauf der Reaktion dient, erfolgt nach dem bekannten Verfahren von KOHLRAUSCH mittels der WHEATSTONESchen Brücke (S. 237 u. 256).

Als Widerstandszelle genügt ein zylindrisches Gläschen, das oben etwas weiter ist als unten. Seine Höhe beträgt 13 cm, sein oberer Durchmesser 4,5 cm, sein unterer 3,5 cm. Von oben ragt in das Gläschen ein Thermometer bis in den untersten Teil hinein. Sonst trägt die Oberseite nur noch einen kleinen offenen Stutzen, durch den die zu untersuchende Flüssigkeit eingefüllt wird, und durch den man auch die Titrierflüssigkeit zufließen läßt. Im untersten Teil sind im Abstände von 1,8 cm die beiden vertikalen Platinelektroden angebracht. Sie werden von Zuführungsdrähten getragen, die in die Wand des Gläschens eingeschmolzen und außerhalb nach unten gebogen sind. Durch Eintauchen dieser Drahtenden in zwei Quecksilbernäpfe wird die leitende Verbindung mit der Brücke hergestellt. Eine Ermittlung der Kapazität des Widerstandsgefäßes ist meistens nicht erforderlich.

Die Ausführung der Titration geschieht in folgender Weise: Man bringt in die sorgfältig mit Wasser gereinigte Widerstandszelle die nötige Menge Flüssigkeit und erwärmt das Gefäß leicht, indem man es mit der Hand umfaßt. Als Temperatur wählt man eine solche, welche die Zimmertemperatur um 4—5° übersteigt. Bei zusammengehörigen Bestimmungen dürfen die Abweichungen von der Temperatur nicht mehr als 0,1° betragen. Die Titerflüssigkeit wird nunmehr in Mengen von je 0,03—0,1 ccm hinzugefügt, und nach jedem Zusatz wird die Leitfähigkeit ermittelt und der gefundene Wert graphisch aufgetragen. Das zugesetzte Reagens ruft zunächst eine Fällung hervor, nach deren Beendigung mischt es sich unverändert mit der Flüssigkeit. Der Knickpunkt der Kurve entspricht also der eben beendigten Ausfällung.

Tabelle 9.

| Acidität der Lösung (ccm N.-Lösung je Liter) | Menge der Lösung ccm | Lösung A ccm |
|--|----------------------|--------------|
| < 90   | 25                   | 25           |
| 90—115                                       | 20                   | 30           |
| 115—140                                      | 15                   | 35           |
| > 140  | 10                   | 40           |

Tabelle 10.

| Acidität der Lösung (ccm N.-Lösung je Liter) | Menge der Lösung ccm | Lösung A ccm | Lösung B ccm |
|--|----------------------|--------------|--------------|
| < 90   | 25                   | 0            | 25           |
| 90—115                                       | 20                   | 5            | 25           |
| 115—140                                      | 15                   | 10           | 25           |
| > 140  | 10                   | 15           | 25           |

Bestimmung der Summe von Weinsäure + Äpfelsäure + Bernsteinsäure. Man bringt mittels kalibrierter Pipette in das Leitfähigkeitsgefäß die aus der Tabelle 9 zu ersiehende Menge der Lösung, die je nach der Acidität wechselt. Man fügt die gleichfalls verzeichnete Menge Lösung A hinzu, säuert schwach mittels 0,5 ccm 0,1 N.-Essigsäure an, mischt durch Umschwenken und titriert mittels der Lanthannitratlösung, die man in Anteilen von je 0,1—0,2 ccm zugibt.

Bestimmung der Summe von Weinsäure + Äpfelsäure. Man bringt die aus der Tabelle 10

zu ersiehenden Flüssigkeitsmengen in das Leitfähigkeitsgefäß, fügt 1 ccm Eisessig hinzu, mischt und titriert gleichfalls mittels der Lanthannitratlösung, die man in Anteilen von je 0,1—0,15 ccm hinzufügt.

Bestimmung der Weinsäure allein. Man bringt in das Leitfähigkeitsgefäß die aus der Tabelle 11 ersichtlichen Flüssigkeitsmengen, gibt 5 ccm

Tabelle 11.

| Wein- + Äpfel- + Bernsteinsäure Millival in 11 Säurelösung | Erste Titrierung |              | Zweite Titrierung |              |
|--|------------------|--------------|-------------------|--------------|
|  | Säurelösung ccm  | Lösung A ccm | Säurelösung ccm   | Lösung A ccm |
| < 70   | 25               | 0            | 20                | 5            |
| 70—90  | 20               | 5            | 15                | 10           |
| 90—110   | 15               | 10           | 10                | 15           |
| 110—130  | 10               | 15           | 5                 | 20           |

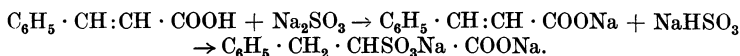


Eisessig und 75 ccm Alkohol (95%) hinzu, mischt und titriert mittels Bariumacetatlösung. Der Verbrauch entspreche  $t$  ccm für 1 l Flüssigkeit; die Differenz dieses Wertes gegen die zuvor ermittelte Summe von Weinsäure + Äpfelsäure sei gleich  $m$  ccm N.-Lösung für 1 l. Ist der Quotient  $t/m$  gleich oder größer als 3,7, so sind die Größen  $t$  und  $m$  bereits das richtige Maß für den Gehalt der Flüssigkeit an Weinsäure und Äpfelsäure. Ist der Quotient jedoch kleiner als 3,7, so bedarf es einer zweiten Titrierung unter Zugabe einer bekannten Menge 0,5 N.-Natriumtartratlösung. Für diese bringt man die in der Tabelle 11 vermerkten Flüssigkeitsmengen in das Leitfähigkeitsgefäß und fügt für je 1 ccm der Säurelösung etwa  $\frac{3,7-t}{1000}$  ccm 0,5 N.-Natriumtartratlösung hinzu, die genau abzumessen ist. Ferner gibt man 5 ccm Eisessig und 75 ccm Alkohol (95%) hinzu, mischt und titriert mittels Bariumacetatlösung. Die Ergebnisse dieser zweiten Titration sind dann die richtigen; selbstverständlich muß man von der gefundenen Menge Weinsäure den Betrag der zugesetzten Weinsäure abziehen.

### 6. Bestimmung von Zimtsäure und Benzoesäure.

a) Verfahren von A. W. K. DE JONG<sup>1</sup>. Das Gemisch der beiden Säuren in Schwefelkohlenstoff wird mit einer Lösung von Brom in Schwefelkohlenstoff versetzt und letzterer sowie das überschüssige Brom nach 24 Stunden abdestilliert und der Rückstand gewogen. Dieser wird darauf im RIBBERSchen Apparat auf 100° erhitzt, wobei die Benzoesäure übersublimiert, während die Dibromzimtsäure zurückbleibt und gewogen wird. Da bei längerer Einwirkung von Brom mehr als 2 Atome davon addiert werden können, empfiehlt DE JONG folgendes Verfahren: Man löst das Gemisch beider Säuren in Natronlauge, fällt sie mit Salzsäure wieder aus und läßt darauf eine wäßrige etwa 0,02 N.-Bromlösung einwirken, bis die Lösung eine gelbe Farbe angenommen hat und sich innerhalb 5 Minuten nicht mehr entfärbt. Dann titriert man nach Zusatz von Kaliumjodid das ausgeschiedene Jod.

b) Verfahren von J. BOUGAULT und MOUCHEL-LA-FOSSE<sup>2</sup>. Die ungesättigte Zimtsäure reagiert mit Natriumsulfit unter Bildung von Sulfosäure in folgender Weise:



Man erhitzt das Gemisch beider Säuren mit einem Gemisch von 1,5 g Natriumsulfit und 2 g Natriumbisulfitlösung im zugeschmolzenen Rohr 5 Stunden im siedenden Wasserbade und schüttelt aus dem Reaktionsprodukt nach dem Ansäuern mit Salzsäure die unveränderte Benzoesäure mit Äther aus. Die aus der Zimtsäure entstandene Sulfosäure ist leicht löslich in Wasser; aus der Lösung kann die Zimtsäure durch Erhitzen mit wäßriger Natronlauge auf 160° als Natriumsalz regeneriert werden.

<sup>1</sup> A. W. K. DE JONG: Rec. Trav. chim. Pays-Bas 1909, 28, 342 u. 1911, 30, 223; C. 1910, I, 479 u. 1912, I, 162.

<sup>2</sup> J. BOUGAULT u. MOUCHEL-LA-FOSSE: Compt. rend. Paris 1913, 156, 396; C. 1913, I, 1114. — L. ROSENTHALER: Nachweis organischer Verbindungen, S. 301. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914.

## Anhang. Gerbstoffe.

Als Gerbstoffe, auch Gerbsäuren genannt, bezeichnete man früher eine Reihe von nur im Pflanzenreiche vorkommenden amorphen Stoffen verschiedener Konstitution, die im wesentlichen die gemeinsamen Eigenschaften besitzen, daß sie bei zusammenziehendem Geschmack und adstringierender Wirkung auf die Schleimhaut lösliche Proteine und insbesondere Leim aus ihren wäßrigen Lösungen ausfällen und damit tierische Haut gerben, d. h. in Leder umwandeln, daß sie ferner mit Ferrisalzen dunkelblaue oder -grüne Färbungen oder Fällungen geben usw. Heute versteht man darunter Stoffe, die sich aus Phenolen und cyclischen Oxysäuren aufbauen, im übrigen aber verschiedener Natur sind, insbesondere auch nicht alle die tierische Haut gerben. Weitere Angaben über Konstitution, Darstellung usw. der Gerbstoffe siehe Bd. I, S. 510—568.

**Eigenschaften.** Die Gerbstoffe sind leicht löslich in Wasser; Mineralsäuren und -salze setzen aber ihre Löslichkeit herab. Die Gerbstoffe besitzen meist Säurecharakter, teils durch ihre Carboxylgruppen, teils durch die phenolischen Hydroxylgruppen.

Methyl-, Äthyl- und Amylalkohole, ferner Aceton, Essigester und Äther, sowie auch Pyridin sind vielfach gute Lösungsmittel, dagegen lösen Benzin, Benzol, Chloroform usw. sie nicht. — Die Gerbstoffe reduzieren Fehlingsche Lösung und andere Schwermetallsalze, ferner Kaliumpermanganat, Jod und Wasserstoffsuperoxyd; sie zeigen großes Verbindungsbestreben und bilden vielfach kolloidale Verbindungen.

Zu den wichtigsten Gerbstoffen gehören die Gallussäure und das Tannin, die hier in erster Linie behandelt werden sollen, während hinsichtlich der nur in einzelnen Lebensmitteln vorkommenden Gerbstoffe, wie Kaffee-, Tee-, Wein-gerbstoffe usw., auf die betreffenden Abschnitte dieses Handbuches verwiesen sei, und die technischen Ledergerbstoffe hier überhaupt nicht behandelt werden.

**Gallussäure** (3,4,5-Trioxibenzoessäure),  $C_7O_6H_5 \cdot H_2O$ , verliert ihr Krystallwasser bei 100—120° und schmilzt dann bei 239—240°; bei weiterem Erhitzen zerfällt sie in Pyrogallol und Kohlensäure. Sie löst sich in 130 Tln. Wasser von 12,5°, in 3 Tln. siedendem Wasser und in 4,5 Tln. Alkohol. Die wäßrige Lösung färbt sich mit Natronlauge allmählich braunrot. Kalk- und Barytwasser rufen blaugrüne oder blaue Fällungen hervor. Ferrisalze erzeugen einen blauschwarzen Niederschlag, der in überschüssigem Ferrisalz und N.-Essigsäure löslich ist; in verdünnten Lösungen entsteht kein Niederschlag, sondern nur Schwarzfärbung. Gallussäure wird in verdünnter Lösung durch Leimlösung nicht gefällt, wohl aber in 10%iger Lösung und in verdünnter durch Zusatz von Natriumchlorid; Gallussäure besitzt daher keine ledergerbende Wirkung.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an Gallussäure folgende Reinheitsanforderungen:

„Die heiß bereitete wäßrige Lösung (1 + 19) muß farblos oder darf höchstens schwach gelb gefärbt sein. Die kalt gesättigte wäßrige Lösung darf durch eine Lösung von Eiweiß oder weißem Leim (Gerbsäure) nicht gefällt und nach Zusatz von Salzsäure durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure) nicht getrübt werden. — 0,2 g Gallussäure dürfen durch Trocknen bei 100° höchstens 0,02 g an Gewicht verlieren und nach dem Verbrennen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.“

**Tannin** (Gallotannin, Gallusgerbsäure, „Gerbsäure“ schlechthin), Mol.-Gewicht 321,2, ist ein Gemisch verschiedener Glucoside, nach NIERENSTEIN insbesondere ein solches von Didigalloylglucose und Digallussäureanhydrid. Das Verhältnis dieser beiden Bestandteile scheint bei den Tanninen verschiedenen Ursprungs (aus verschiedenen Gallen stammend) ein verschiedenes zu sein (S. 1177); daher ist auch der Glucosegehalt je nach den Herkünften anscheinend

verschieden. Die wäßrige Lösung des Tannins ist optisch aktiv (rechtsdrehend). Bei der Hydrolyse mit Säuren werden Gallussäure und Glucose gebildet, beim Erhitzen entsteht unter anderem Pyrogallol. — Tannin ist in etwa gleichen Teilen Wasser und 2 Tln. Alkohol (90%) löslich, ferner leicht löslich in Aceton, Essigester, Eisessig und Pyridin, unlöslich in Äther, Chloroform, Benzol, Petroläther. — Es wird aus wäßrigen Lösungen durch Mineralsäuren und viele Salze (Kalium- und Natriumchlorid, Kaliumacetat usw.) ausgeschieden, nicht dagegen durch Kaliumnitrat und Natriumsulfat. Tannin gibt mit Albuminen und Leim, sowie mit Alkaloiden schwer lösliche Verbindungen; es wirkt also gerbend. — Mit Ferrisalzen entsteht in Gerbsäurelösungen bei tropfenweisem Zusatz kein Niederschlag, sondern nur Schwarzfärbung, da das Ferritannat in freier Gerbsäure löslich ist, dagegen entsteht in neutralen und schwach essigsäuren (0,1 N.) Tannatlösungen ein schwarzer Niederschlag von Ferritannat (S. 1171).

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an „Gerbsäure“ folgende Reinheitsanforderungen:

2 ccm der wäßrigen Lösung (1+4) müssen beim Vermischen mit 2 ccm Alkohol klar bleiben; diese Mischung darf auch durch Zusatz von 1 ccm Äther nicht getrübt werden (Gummi, Dextrin, Zucker, Salze). — 0,2 g Gerbsäure dürfen durch Trocknen bei 100° höchstens 0,024 g an Gewicht verlieren und nach dem Verbrennen keinen wägbaren Rückstand hinterlassen.

## I. Nachweis.

Das Vorhandensein eines Gerbstoffes in einer Lösung kann als erwiesen gelten, wenn sie sich nachstehenden Reaktionen gegenüber positiv verhält, dagegen negativ nach Behandlung der Lösung mit Hautpulver.

Von den Fällungsreaktionen sind als besonders kennzeichnend die Fällungen mit Leim, Alkaloiden, Metallsalzen und Bromwasser anzusehen. Von den Farbenreaktionen ist besonders die Reaktion mit Ferrisalzen kennzeichnend. Für den Nachweis von Gallussäure ist die Kaliumcyanidreaktion eindeutig.

### 1. Fällungsreaktionen.

Die Gerbstoffe geben mit einer Anzahl von Stoffen charakteristische Fällungen, die zum Teil gefärbt sind.

a) **Leimfällung.** Gerbstoffe werden durch Albumin und Leim (Gelatine) gefällt. Die Fällung führt man am besten mit einer 0,5%igen flüssigen Leimlösung aus, zu der man die gleiche Menge einer 0,5%igen Lösung des zu prüfenden Stoffes gibt. Bleibt die Fällung bei gewöhnlicher Temperatur aus, so kann sie bei 0° noch eintreten; oder die Probe muß mit einer stärkeren Gerbstofflösung wiederholt werden.

Nach J. SMORODINZEW und A. ADOWA<sup>1</sup> fördert Zusatz von Natriumchlorid die Leimfällung. Bei  $p_H = 4,9$  ist die Grenzkonzentration für Leim, bei der keine Fällung mehr stattfindet, 0,003%, bei  $p_H = 8,95$ : 0,013%, bei  $p_H = 10,06$ : 0,25%. Die Leimfällungsprobe ist jedoch für Gerbstoffe (Tannin) keineswegs eindeutig, da von 73 Nichtgerbstoffen nach den Versuchen von A. E. JONES<sup>2</sup> 18 eine positive Reaktion gaben.

b) **Alkaloidfällung.** Gerbstoffe geben mit einer Reihe von Alkaloiden Niederschläge; zu dieser Fällung eignen sich besonders Brucin, Coffein, Antipyrin, ferner Chininacetat und -hydrochlorid.

Auch diese Reaktion ist nicht eindeutig für Gerbstoffe, da auch eine Reihe anderer Stoffe, z. B. einfache Phenole, schwer lösliche Verbindungen mit Alkaloiden geben.

<sup>1</sup> J. SMORODINZEW u. A. ADOWA: Zeitschr. physiol. Chem. 1925, 144, 255. Über die Fällungsbedingungen von Leim durch Tannin siehe auch die Arbeiten von H. C. BUNGENBERG DE JONG: Journ. Amer. Leather Chemists Assoc. 1924, 19, 14; C. 1924, I, 2048.

<sup>2</sup> A. E. JONES: Analyst 1927, 52, 275.

e) **Bromwasserfällung.** Bromwasser fällt zahlreiche, namentlich kondensierte Gerbstoffe. Gallusfarbstoffe der Tanninklasse geben diese Reaktion nicht.

Nach H. R. PROCTER<sup>1</sup> verfährt man, wie folgt: Zu der schwach sauren bzw. mit Essigsäure angesäuerten Lösung setzt man tropfenweise Bromwasser, bis die Flüssigkeit nach Brom riecht. Bei Gegenwart von Gerbstoff entsteht sofort ein Niederschlag. Erst nach längerer Zeit sich bildende Niederschläge sind nicht zu berücksichtigen.

d) **Bleisalz-fällung.** Gerbstoffe bilden mit Bleiacetat voluminöse flockige Niederschläge, die in Essigsäure löslich sind, man verwendet daher zweckmäßig das basische Bleiacetat (Bleieisig).

Bleiacetatlösung und Kalilauge geben nach BUCHNER<sup>2</sup> mit wäßrigen Lösungen von Tannin eine rotgefärbte Lösung, während Gallussäure einen carminroten Niederschlag gibt, der sich in Kalilauge mit himbeerroter Farbe löst.

e) **Erdalkalihydroxydfällungen.** Die Erdalkalihydroxyde geben mit Gerbstoffen starke, meist gefärbte Fällungen, die sich gewöhnlich an der Luft durch Oxydation dunkel färben. Kalkwasser ist ein geeignetes Reagens, das von H. R. PROCTER<sup>3</sup> sehr empfohlen wird. Es liefert eine Reihe von gefärbten Niederschlägen, die ziemlich sauerstoffbeständig sind.

Nach G. TODESCHINI<sup>4</sup> und DAVID geben Bariumchloridlösung und Kalilauge mit Tanninlösung einen roten Niederschlag, dessen Farbstärke allmählich zunimmt; mit Gallussäure entsteht ein blauer Niederschlag. Die Reaktion mit Tannin ist je nach der Verdünnung verschieden: Mit einer 1%igen Lösung erhält man eine grüne bis grünlichblaue, mit einer 0,1%igen, besonders bei Anwesenheit von viel Kalilauge, eine rötlichgelbe Fällung, welche an Stärke erst zu-, dann abnimmt. Kalilauge allein bewirkt mit Tannin und mit Gallussäure eine grünliche Färbung, welche beim Schütteln mit Luft in ein starkes Rot übergeht.

#### f) Sonstige Reaktionen.

1. Ähnliche Reaktionen wie Bleilösungen geben auch die Salze von Zinn, Kupfer (S. 1176), Nickel und Aluminium. — 2. Kalium- und Ammoniumsalze — nicht Natriumsalze — geben in alkoholischen Lösungen schwer lösliche Gerbstoffverbindungen. — 3. Von BAEMES<sup>5</sup> ist zum Nachweise von Tannin Natriumwolframatlösung (gelber Niederschlag) vorgeschlagen. — 4. WALDEN<sup>6</sup> beschreibt eine Reaktion des Tannins mit Arsensäure.

## 2. Farbenreaktionen.

a) **Reaktion mit Ferrisalzen.** Gerbstofflösungen geben mit verdünnten Ferrisalzlösungen hell- bis dunkelblaue Färbungen. Ein Überschuß von Ferrichlorid ist zu vermeiden, da er den Färbungen infolge der Eigenfarbe des Ferrichlorids einen grünlichen Stich gibt; daher ist die Verwendung der weniger gefärbten und weniger hydrolytisch gespaltenen Eisenaunlösung der Ferrichloridlösung vorzuziehen. Die reinsten Färbungen werden nach K. FREUDENBERG<sup>7</sup> in alkoholischen Gerbsäurelösungen mit stark verdünnter alkoholischer Ferrichloridlösung erhalten. In durch Natriumbicarbonat schwach alkalischen Lösungen ist der Farbton mehr blauviolett<sup>8</sup>. Die Reaktion mit Ferrisalzen ist eine allgemeine Phenolreaktion und daher nicht eindeutig für Gerbstoffe.

<sup>1</sup> H. R. PROCTER: Taschenbuch für Gerbereichemiker und Lederfabrikanten 1924, S. 61. — Vgl. auch K. FREUDENBERG: Chemie der natürlichen Gerbstoffe 1920, S. 20.

<sup>2</sup> BUCHNER: Ann. Chem. 53, 357; Zeitschr. analyt. Chem. 1900, 39, 239. — Vgl. auch E. HARNACK: Arch. Pharm. 1896, 234, 537.

<sup>3</sup> Nach M. NIERENSTEIN: Chemie der Gerbstoffe 1910, S. 226.

<sup>4</sup> G. TODESCHINI: L'Orosi 21, 328; Zeitschr. analyt. Chem. 1901, 40, 812.

<sup>5</sup> BAEMES: Drug. Circ. 40, 308; Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 518.

<sup>6</sup> K. FREUDENBERG: Chemie der natürlichen Gerbstoffe 1920, S. 20.

<sup>7</sup> K. FREUDENBERG: Chemie der natürlichen Gerbstoffe 1920, S. 18.

<sup>8</sup> F. KOCH: Arch. Pharm. 1895, 233, 48; Zeitschr. analyt. Chem. 1896, 35, 590.

Gallussäure gibt nach FLÜCKIGER<sup>1</sup> mit oxydfreier Ferrosulfatlösung (1%) und Natriumacetat eine violette Färbung, die auf Zusatz von Mineralsäuren verschwindet.

Unterscheidung von Gerbsäure (Tannin) und Gallussäure. Hierfür empfiehlt RUOSS<sup>2</sup> folgende Reaktionen:

Reaktion I. 10 ccm Gerbsäurelösung werden so weit verdünnt, daß die mit 2 bis 5 Tropfen Ferrisulfatlösung (2%) entstehende gefärbte Lösung in einem Reagensglase von 2 cm Durchmesser noch durchsichtig ist. Darauf fügt man ebensoviel Tropfen Natriumcarbonatlösung (2,8% kryst. Salz) und doppelt soviel Tropfen Essigsäure (Spez. Gewicht 1,04; 0,5% Natriumtartrat enthaltend) hinzu. Nach dem Schütteln und Stehenlassen scheidet sich bei Gegenwart von Gerbsäure ein schwarzer Niederschlag von Ferritannat aus; 1 mg Gerbsäure ist noch nachweisbar. Gallussäure gibt auch eine Färbung, aber keinen Niederschlag.

Reaktion II. Zu 10 ccm Gerbsäurelösung fügt man tropfenweise Ferrisulfatlösung (1% Ferrisulfat + 1,5% Natriumacetat + 0,17% Natriumtartrat enthaltend), bis keine stärkere Schwarzfärbung mehr eintritt und dann ebensoviel Tropfen Leimlösung (0,125 g Gelatine in 12,5 ccm heißem Wasser gelöst und mit 87,5 ccm Essigsäure — Spez. Gewicht 1,064 — versetzt) hinzu und schüttelt. Nach kurzer Zeit fällt die Gerbsäure als flockiger blauschwarzer Niederschlag aus. Bei Gegenwart von Gallussäure bleibt die Lösung schwarz gefärbt.

Reaktion III. Die Gerbsäurelösung wird wie bei der Reaktion I verdünnt. Gibt man zu 10 ccm der neutralen oder schwach sauren Lösung 1 Tropfen Ferrisulfatlösung (2%) hinzu, so gibt Gallussäure eine Schwarzfärbung, welche sofort in Gelb übergeht, Gerbsäure dagegen eine bleibende Schwarzfärbung. — Verwendet man Ferriacetat statt Ferrisulfat, so bleibt die Schwarzfärbung auch bei Gallussäure bestehen.

b) Reaktion mit Kaliumcyanid nach S. YOUNG<sup>3</sup>. Gibt man nach G. GRIGGI<sup>4</sup> zu einer wäßrigen Lösung (1%) von Gallussäure etwas Kaliumcyanid in Substanz oder tropfenweise 1 ccm einer Lösung (1 : 30), so entsteht beim Schütteln oder durch Zusatz von Wasserstoffsperoxyd eine hellrubinrote Färbung, welche beim Stehen, abgesehen von der Oberfläche, verschwindet und beim Schütteln wieder entsteht, abermals verschwindet usw. Bei Anstellung der Reaktion ist die Wasserstoffzahl zu berücksichtigen und unter Umständen durch Zusatz von 0,1 N.-Lauge zu korrigieren. Mit Tannin tritt keine Farbreaktion und mit Di- und Pyrogallussäure nur eine Gelbrotfärbung ein.

Nach K. FREUDENBERG<sup>5</sup> kann man die Reaktion noch empfindlicher gestalten, wenn man einen Tropfen der Gallussäure-Kaliumcyanidlösung auf Filtrierpapier bringt. Die anfangs fast farblose Stelle wird rot; nach etwa 15 Sekunden ist der Höhepunkt der Färbung erreicht. Das Rot verblaßt und macht einem kräftigen Schwefelgelb Platz. Tannin und alle anderen Verbindungen, die gebundene Gallussäure enthalten, zeigen die Kaliumcyanidreaktion, im Reagensglas ausgeführt, nicht oder außerordentlich schwach. In dieser Form dient die Reaktion zur Unterscheidung von gebundener und freier Gallussäure. Auf dem Filtrierpapier ausgeführt, ist die Reaktion hierfür zu scharf, da die geringen Mengen der durch Hydrolyse während der Reaktion aus dem Tannin freier werdenden Gallussäure zu der Annahme verleiten können, diese sei in freiem Zustand beigemischt.

e) Reaktion mit Kaliumbichromat. Gerbstofflösungen geben mit konz. Kaliumbichromatlösung dunkelrote bis braune Niederschläge; CH. M. FEAR<sup>6</sup> setzt zu 1 ccm Gerbstofflösung (1%) 1 ccm konz. Kaliumbichromatlösung; gefällt werden hierbei unter anderen Stoffen Gallussäure, Gallotannin, Pyrogallolgerbstoffe.

Nach BENNETT<sup>7</sup> versetzt man 2—3 ccm der zu untersuchenden Gerbstofflösung mit 2—3 ccm Natriumsulfatlösung (10%) und 1—2 Tropfen Kalium-

<sup>1</sup> FLÜCKIGER: Pharm. Chemie 1879, 305; Mercks Reagenzien-Verz. 1929, 183.

<sup>2</sup> RUOSS: Zeitschr. analyt. Chem. 1902, 41, 717. — Vgl. auch E. ATKINSON u. E. O. HAZLETON: Biochem. Journ. 1822, 16, 48; C. 1922, II, 785.

<sup>3</sup> S. YOUNG: Chem. News 1883, 48, 31; Zeitschr. analyt. Chem. 1884, 23, 227. — S. LOEWE u. F. LANGE: Arch. Pharm. 1925, 263, 107.

<sup>4</sup> G. GRIGGI: Boll. chim. farmac. 1898, 38, 5; C. 1899, I, 454.

<sup>5</sup> K. FREUDENBERG: Chemie der natürlichen Gerbstoffe 1920, S. 19.

<sup>6</sup> CH. M. FEAR: Analyst 1929, 54, 227.

<sup>7</sup> Nach E. STIASNY: Collegium 1912, 483; C. 1912, II, 1405.

chromatlösung (10%). Catechugerbstoffe bewirken eine grüne Färbung; von den Pyrogallolgerbstoffen geben Myrobalanen- und Sumachgerbstoffe, sowie Gallusgerbsäure eine blaurote Färbung, die rasch in Braun umschlägt; Valonen-, Kastanien- und Eichenholzextrakte geben eine tiefrotviolette, ziemlich beständige Färbung.

**d) Reaktion mit Formaldehyd.** Zum Nachweise von Pyrogallol- neben Catechugerbstoffen werden etwa 50 ccm Gerbstofflösung (0,35—0,45%) mit 5 ccm konz. Salzsäure und 10 ccm Formaldehydlösung (40%)  $\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler gekocht, gut abgekühlt und filtriert. Etwa 10 ccm des Filtrates werden mit etwa 1 ccm Eisenalaunlösung (1%) und 5 g festem Natriumacetat, ohne zu schütteln, versetzt. Bei Gegenwart von Gerbstoffen tritt Bildung einer blauen oder violetten Färbung am Boden des Reagensglases ein<sup>1</sup>.

Nach S. A. CELSI<sup>2</sup> löst man eine Spur Substanz in 1 ccm konz. Essigsäure und versetzt mit einigen Tropfen Formaldehydlösung. Auf Zusatz von wenigen Tropfen konz. Salzsäure zu der erwärmten Lösung entsteht eine kirschrote Färbung, die bei Zusatz von Essigsäure bestehen bleibt. Die Reaktion gelingt noch in einer Verdünnung von 1 : 100 000. Positiv ist dieser Nachweis nach dem Erhitzen im Reagensglas bei Gallussäure, Tannin, Tannigen, Tanniform, Tannalbin.

**e) Reaktion mit Phosphorwolfram- und Molybdänsäure.** Nach G. REIF<sup>3</sup> löst man zur Darstellung des Reagens 3 g Natriumwolframat, 2 g Natriumphosphat und 0,05 g Molybdänsäure unter Erhitzen auf dem Wasserbade in 25 g Wasser, läßt abkühlen und neutralisiert mit Salpetersäure gegen Lackmus. Man versetzt 10 ccm der zu prüfenden Lösung mit 0,5 ccm Salzsäure (10%) und 1 ccm Reagens. Beim Erhitzen entsteht bei Anwesenheit von Gerbsäure eine Violettfärbung.

**f) Reaktion mit Ammoniummolybdat.** Nach GARDINER<sup>4</sup> werden Gerbsäurelösungen durch Ammoniummolybdat intensiv gelbbraun bis dunkelbraun gefärbt, aber nicht gefällt. Verwendet man als Reagens eine Salpetersäure enthaltende Lösung von Ammoniummolybdat, so hat man ein äußerst empfindliches Reagens auf Gerbsäure und Gallussäure, die in einer Lösung von 1 : 100 000 durch dieses Reagens noch bräunlichgelb gefärbt werden.

**g) Reaktion mit Jod.** Nach O. SCHEWKET<sup>5</sup> schüttelt man 2 ccm einer 1%igen Gallus- oder Gerbsäure- (Tannin-) Lösung mit 3 ccm einer Lösung von Jod (1%) in Kaliumjodid (2,5%) und setzt 300—500 ccm einer sehr verdünnten Alkalicarbonatlösung — auch einer Lösung von Natriumborat, Dinatriumphosphat und Kaliumformiat, -acetat, -tartrat, -citrat, -oxalat — hinzu; es entstehen kräftige rotviolette Färbungen. Verdünnte Mineralsäuren und konz. Alkalilösungen sowie ein Überschuß an Tannin stören die Reaktion.

**h) Reaktion mit Phenylhydrazin.** Nach BÖTTINGER<sup>6</sup> erhitzt man eine kleine Menge der zu prüfenden Substanz mit der doppelten Menge Phenylhydrazin einige Minuten auf 100° und gibt nach dem Verdünnen mit Wasser und nochmaligem Erhitzen 1—2 Tropfen der Flüssigkeit in ein großes Becherglas voll Wasser, das mit Natronlauge alkalisch gemacht ist. Es entsteht bei

<sup>1</sup> Nach E. STIASNY: Collegium 1912, 483; C. 1912, II, 1405.

<sup>2</sup> S. A. CELSI: Revista Centro Estudiantes Farmacia Bioquímica 1828, 16, 642; C. 1928, I, 2850.

<sup>3</sup> G. REIF: Z. 1925, 50, 192.

<sup>4</sup> GARDINER: Enzyklop. ges. Pharm. 1888, 4, 508; Mercks Reagenzien-Verz. 1929, S. 200.

<sup>5</sup> O. SCHEWKET: Biochem. Zeitschr. 1913, 52, 271. — Vgl. auch Zeitschr. analyt. Chem. 1871, 10, 43.

<sup>6</sup> BÖTTINGER: Ann. Chem. 1890, 256, 341; Chem.-Ztg. 1890, 14, Rep. 152 u. 191.

Anwesenheit von Tannin eine blaue Färbung, die allmählich in Gelb übergeht. Gallussäure bewirkt eine gelbe bis orangegelbe Färbung.

i) **Sonstige Reaktionen.** 1. Nach M. NIERENSTEIN<sup>1</sup> entsteht mit wenig Alkalilauge bei Gallussäure eine grüne, bei Tannin eine rote Färbung. — 2. Nach H. R. PROCTER<sup>2</sup> geben Gerbstofflösungen mit Kaliumarseniat grüne, auf Säurezusatz rotviolette Färbungen. — 3. Nach A. SEYDA<sup>3</sup> gibt Auronatriumchlorid mit schwachen Gerbsäurelösungen purpurrote Färbungen und mit konz. Lösungen ebensolche Fällungen.

### Mikrochemischer Nachweis.

Für den Nachweis von Gallussäure können die nadelförmigen Krystalle der Säure selbst dienen, die man erhält, wenn man eine Gallatlösung mit etwas Essigsäure versetzt<sup>4</sup>. — Nach J. M. KORENMAN<sup>5</sup> entstehen beim Zusatz von Hexamethylenlösung (10%) zu einer Gallussäurelösung charakteristische Krystalle von Parallelogrammform, oft mit abgestumpften Ecken. — Nach BEHRENS<sup>6</sup> geben auch Bariumacetat und Zinkacetat in Gallaten kennzeichnende Krystallbildungen. Über den Nachweis von Gerbstoffen in Pflanzenteilen siehe Bd. I, S. 535.

## II. Bestimmung.

Verfahren zur Bestimmung der Gerbstoffe gibt es eine große Zahl<sup>7</sup>; die meisten von ihnen sind aber für die Untersuchung von Gerbmaterialein der Lederindustrie und von Tinten bestimmt. Über die Verfahren, welche in erster Linie für die Untersuchung von Drogen in Frage kommen, haben O. LINDE und H. TEUFER<sup>8</sup> vergleichende Untersuchungen angestellt und kommen dabei zu folgenden Ergebnissen: Das gewichtsanalytische Hautpulververfahren ist in allen Fällen brauchbar, während das in der Technik viel verwendete titrimetrische Verfahren nach LOEWENTHAL-V. SCHRÖDER niedrigere Ergebnisse liefert und insofern auf unsicherer Grundlage beruht, als bei der Einstellung der Kaliumpermanganatlösung das wenig gut definierte Tannin verwendet werden muß. Die Bestimmungsverfahren mit Kupferacetat und Zinnchlorür ergeben zwar etwas niedrigere Werte als das gewichtsanalytische Hautpulververfahren, eignen sich aber sehr wohl zur Gerbstoffbestimmung in Drogen.

1. **Hautpulververfahren.** Das Verfahren beruht darauf, daß die Gerbstoffe der Lösung mittels Hautpulver entzogen werden, vor und nach dieser Entziehung bei dem gewichtsanalytischen Verfahren die Menge der gelösten organischen Stoffe bestimmt wird, während bei dem maßanalytischen Verfahren durch Behandlung mit Kaliumpermanganatlösung die Menge der oxydierbaren organischen Stoffe bestimmt wird.

Das zu verwendende Hautpulver muß feinvollig und weiß sein; es darf keine in kaltem Wasser löslichen Stoffe enthalten bzw. beim titrimetrischen Verfahren keine solchen, die Kaliumpermanganat reduzieren. Sind solche Stoffe vorhanden, so muß es entweder vorher durch Ausziehen mit Wasser von ihnen befreit und bei gewöhnlicher Temperatur wieder getrocknet und zerkleinert werden oder es muß in einem Leerversuch mit etwa 3 g die Menge der reduzierenden Stoffe bestimmt und von dem Bestimmungsergebnis in Abzug gebracht werden<sup>9</sup>.

<sup>1</sup> M. NIERENSTEIN: *Chemie der Gerbstoffe* 1910, S. 226.

<sup>2</sup> H. R. PROCTER: *Zeitschr. analyt. Chem.* 1874, **13**, 326.

<sup>3</sup> A. SEYDA: *Chem.-Ztg.* 1898, **22**, 1085.

<sup>4</sup> J. SCHMIDT: In G. KLEINs *Handbuch der Pflanzenanalyse* Bd. 2, S. 490. Berlin: Julius Springer 1932.

<sup>5</sup> J. M. KORENMAN: *Pharm. Zentralh.* 1929, **70**, 709.

<sup>6</sup> BEHRENS: *Anleitung zur mikrochemischen Analyse, Organischer Teil*, S. 87.

<sup>7</sup> J. DEKKER gibt in seinem 1913 erschienenen Werke „Die Gerbstoffe“ (Berlin: Gebrüder Bornträger) bereits 86 Gerbstoffbestimmungsverfahren an.

<sup>8</sup> O. LINDE u. H. TEUFER: *Pharm. Zentralh.* 1929, **70**, 21 u. 53.

<sup>9</sup> H. R. PROCTER und S. HIRST (*Journ. Soc. chem. Ind.* 1909, **28**, 294; *C.* 1909, **I**, 1613) haben das titrimetrische Verfahren von LOEWENTHAL abgeändert und empfehlen die Verwendung von frisch chomiertem Hautpulver; dieses fällt aber bedeutend mehr „reduzierende Nichtgerbstoffe“. — Vgl. auch H. G. BENNET: *Zeitschr. analyt. Chem.* 1918, **57**, 184.

a) Gewichtsanalytisches Verfahren. Das Verfahren wird nach J. v. SCHROEDER<sup>1</sup> in folgender Weise ausgeführt: 100 ccm der klaren Gerbstofflösung, die nicht mehr als 3,5—4,5 g Gerbstoff im Liter enthalten darf, werden in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, der Rückstand bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen und verascht. Man erhält so die Gesamtmenge der organischen Stoffe. Weitere 200 ccm der Gerbstofflösung schüttelt man mit 10 g Hautpulver  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde lang, filtriert durch ein Tuchfilter, preßt vom Hautpulver ab und behandelt das Filtrat nochmals 20—24 Stunden mit 4 g Hautpulver. Von dem klaren Filtrat dampft man 100 ccm ein und verfährt genau wie oben. Auf diese Weise erhält man die organischen „Nichtgerbstoffe“. Die Differenz beider Bestimmungen ergibt den Gerbstoffgehalt der Lösung.

b) Maßanalytisches Verfahren nach LOEWENTHAL-V. SCHROEDER<sup>2</sup>. Die zu untersuchende Gerbstofflösung wird in der gleichen Weise wie unter a) mit Hautpulver behandelt und vor und nach dieser Behandlung mit Kaliumpermanganatlösung oxydiert, wobei Indigolösung als Indicator dient. Die Differenz zwischen beiden Titrationen ist gleich dem Reduktionswert der Gerbstoffe. Der Wirkungswert der Kaliumpermanganatlösung wird gegen eine Tanninlösung eingestellt.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Permanganatlösung<sup>3</sup>. 10 g reinstes Kaliumpermanganat werden mit frisch ausgekochtem Wasser zu 6 l gelöst. Zur Einstellung löst man 2 g lufttrockenes reines Tannin in 1 l Wasser und bestimmt den gesamten Kaliumpermanganatverbrauch von 10 ccm dieser Lösung und 20 ccm Indigolösung, deren bekannter Reduktionswert abzuziehen ist. Ferner bestimmt man den Kaliumpermanganatverbrauch der mit Hautpulver behandelten Tanninlösung, indem man 50 ccm Tanninlösung mit 3 g Hautpulver, das zuvor eingeweicht und dann wieder ausgepreßt war, unter öfterem Schütteln 18—20 Stunden behandelt, dann filtriert und hiervon 10 ccm mit Kaliumpermanganat und Indigo titriert. Beträgt der Verbrauch an Kaliumpermanganat des Hautfiltrates nicht mehr als 10% des Gesamtverbrauchs, so ist das Tannin zur Titerstellung brauchbar. Durch Trocknen bei 100° bis zum konstanten Gewicht bestimmt man seinen Wassergehalt und berechnet aus dem Gesamt-Kaliumpermanganatverbrauch den Titer auf die Trockensubstanz des Tannins. Den so erhaltenen Titer multipliziert man mit 1,05, um den wahren Titer des Kaliumpermanganats zu finden.

2. Indigolösung. 10 g Indigotine (Indigo-schwefelsaures Natrium) werden in 1 l verdünnter Schwefelsäure (1 : 5 Vol.) gelöst und diese Lösung wird mit 1 l Wasser verdünnt.

3. Tanninlösung<sup>4</sup>. 2 g lufttrockenes reinstes Tannin werden mit Wasser zu 1 l gelöst.

**Ausführung der Titration.** Zu der die Indigo- und Gerbstofflösung enthaltenden, auf  $\frac{3}{4}$  l verdünnten Flüssigkeit läßt man aus einer Bürette 1 ccm-weise die Kaliumpermanganatlösung fließen und rührt nach jedem Zusatz 5—10 Sekunden stark um. Ist die Flüssigkeit hellgrün geworden, so läßt man nur je 2—3 Tropfen einfließen, und zwar so lange, bis die Flüssigkeit rein goldgelb erscheint. Um das Ende der Reaktion scharf erkennen zu können, stellt man das Becherglas auf ein weißes Papier.

Bei der Ausführung einer Gerbstoffbestimmung muß man möglichst genau dieselben Bedingungen einhalten wie bei der Titerstellung. Da die gerbstoffhaltigen Materialien auch solche reduzierenden Substanzen enthalten können, die nicht Gerbstoffe sind, so bestimmt man in 10 ccm ihrer wäßrigen Lösung den Kaliumpermanganatverbrauch, hierauf nach dem Ausfällen mit Hautpulver (3 g auf 50 ccm der Lösung) die zur Oxydation notwendige Kaliumpermanganatlösung. Die Differenz beider Titerwerte ergibt den Kaliumpermanganatverbrauch, welcher der vorhandenen Gerbstoffmenge entspricht. Die Gerbstofflösung muß einen derartigen Gehalt haben, daß 10 ccm 4—10 ccm Permanganat-

<sup>1</sup> E. SCHMIDT: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, 6. Aufl., Bd. 2, 1575.

<sup>2</sup> C. COUNCLER u. J. v. SCHROEDER: Versamml. Gerbstoffbestimmungs-Kommission Berlin 1883. Bericht Cassel 1885. Verlag Theodor Fischer. Zeitschr. analyt. Chem. 1886, 25, 121.

<sup>3</sup> E. MARTIN (Chim. et Ind. 1927, 17, Sonder-Nr. 556; C. 1928, I, 1132) empfiehlt die Anwendung von Kaliumdichromatlösung und titriert deren Überschuß mittels einer eingestellten Ferrosalzlösung unter Tüpfeln mit Ferricyankalium zurück.

<sup>4</sup> E. R. PROCTER u. S. HRST (S. 1174) empfehlen statt der Einstellung gegen Tannin eine solche gegen Gallussäure.



lösung reduzieren. Zwischen Gerbstoffgehalt und Permanganatverbrauch herrscht nicht vollständige Proportionalität, da der Permanganatverbrauch von der Konzentration der Lösungen abhängig ist.

**2. Bestimmung von Tannin als Ferritannat.** Nach RUOSS<sup>1</sup> werden 50 ccm Gerbstofflösung in einem 250-ccm-Kolben zuerst mit 10 ccm 0,5 N.-Natriumcarbonatlösung (7,136 g krystallinisches Salz in 100 ccm), dann mit 10 ccm Ferrisulfatlösung (5%) geschüttelt und nun sofort mit 25 ccm essigsaurer Natriumtartratlösung (80 ccm Essigsäure vom Titer 7,5 + 20 ccm 2,5%iger Natriumtartratlösung) versetzt, kräftig geschüttelt, zum Sieden erhitzt, 1 Minute in lebhaftem Sieden erhalten und filtriert. Der Niederschlag wird mit heißem Wasser ausgewaschen, bis das Waschwasser eisenfrei (Kaliumrhodanid + Salzsäure) ist. Nach dem Trocknen wird der Niederschlag verascht und der Rückstand (Eisenoxyd) gewogen.  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \times 4,024 = \text{Gerbsäure}$ .

Durch die obige Art der Fällung wird basisches Ferritannat abgeschieden, aus dem durch das Waschen mit Wasser der Eisenüberschuß entfernt wird, so daß normales Ferritannat zurückbleibt.

**3. Bestimmung mit Kupferacetat<sup>2</sup>.** Man versetzt die Gerbstofflösung mit einem geringen Überschuß neutraler Kupferacetatlösung (4%) — die Lösung muß grüngelblich sein —, kocht die Lösung auf, filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn bis zum Verschwinden der Kupferreaktion aus, trocknet und verascht ihn, behandelt die Asche mit Salpetersäure und glüht. Kupferoxyd  $\times 1,305 = \text{Gerbstoff}$ . Da die verschiedenen Gerbstoffverbindungen keinen einheitlichen Kupfergehalt haben, ist es vorzuziehen, den Kupferniederschlag auf einem gewogenen Filter zu sammeln, ihn nach dem Trocknen zu wägen und seine Asche als Kupferoxyd in Abzug zu bringen. Die Differenz ist der Gerbstoffgehalt.

Wenn die Gerbstofflösung auch Gallussäure und Pektinstoffe enthält, so entfernt man erstere vor dem Kupferacetatzusatz durch Ausschütteln mit Äther und letztere nach dem Vorschlage von GAWALOWSKI durch Eindampfen der Gerbstofflösung zur Sirupkonsistenz, Behandeln mit Alkohol-Äther (2 + 1) und Abfiltrieren der ausgeschiedenen Pektinflocken. Nach dem Abdampfen des Alkohol-Äthers fällt man die Gerbstoffe mit Kupferacetat.

**4. Bestimmung mit Zinnchlorürlösung.** Nach H. RISLER-BEUNAT<sup>3</sup> fällt man einen wäßrigen Gerbstoffauszug mit einer Zinnchlorürlösung, welche 8 g Stannochlorid und 2 g Natriumchlorid im Liter enthält. Von dieser Lösung wird unter Umrühren so lange zugesetzt, wie noch ein Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag wird auf einem getrockneten, gewogenen Filter gesammelt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und gewogen, wobei sich die Menge des Zinntannats ergibt. Hierauf wird das Filter mit Inhalt in einem Tiegel verascht, mit Ammoniumnitrat geglüht, wobei sich Stannioxyd ( $\text{SnO}_2$ ) bildet, und nach dem Erkalten gewogen. Das Gewicht des Stannioxyds wird auf Stannioxyd ( $\text{SnO}$ ) umgerechnet ( $100 \text{ Tle. SnO}_2 = 89,38 \text{ Tle. SnO}$ ) und dieses Gewicht von dem des Zinntannats abgezogen.

Gallussäure wird nicht gefällt.

**5. Colorimetrische Bestimmung von Gallussäure und Tannin** von C. A. MITCHELL<sup>4</sup>. Die Verfahren sind zur Bestimmung kleiner Mengen von Pyrogallol, Gallussäure und Tannin (Gallotannin) und auch zur Bestimmung von Pyrogallol und Gallussäure je neben Tannin geeignet. Die farbgebende Verbindung

<sup>1</sup> RUOSS: Zeitschr. analyt. Chem. 1902, 41, 717.

<sup>2</sup> H. FLECK: Gerber-Ztg. 1860, Nr. 2, 3, 4. — E. WOLFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1862, 1, 103. — J. M. EDER: Zeitschr. analyt. Chem. 1880, 19, 106. — A. GAWALOWSKI: Zeitschr. analyt. Chem. 1882, 21, 552; 1893, 32, 616; 1915, 54, 403. — O. LINDE u. H. TEUFER: Pharm. Zentralh. 1929, 70, 21.

<sup>3</sup> H. RISLER-BEUNAT: Zeitschr. analyt. Chem. 1863, 2, 287. — O. LINDE u. H. TEUFER: Pharm. Zentralh. 1929, 70, 21.

<sup>4</sup> C. A. MITCHELL: Analyst 1923, 48, 2; 1924, 49, 162; C. 1923, II, 862; 1924, II, 787. Vgl. auch W. N. NICHOLSON u. D. RHIND: Analyst 1924, 49, 505; C. 1925, I, 926.

ist in allen Fällen die Pyrogallolgruppe  $C_6H_2(OH)_3$ . Die Farbstärke ist dem Gehalt der Lösung an Gerbstoff proportional.

a) Verfahren mit Ferrosulfat. Es beruht darauf, daß Ferrosulfat in Gegenwart eines Tartrates mit Gallussäure und Tannin eine konstante lösliche Verbindung eingeht, deren sehr beständige Färbung in sehr verdünnten Lösungen rötlich violett und in konz. Lösungen blauviolett ist und mit der von Gallussäurelösungen von bekanntem Gehalt in HEHNERSchen Zylindern mit seitlichem Abflußhahn verglichen wird.

Je 1 ccm einer Lösung von 0,1 g Gallussäure oder Tannin in 100 ccm oder 1 ccm der zu untersuchenden Gerbstofflösung gibt man zu 95 ccm Wasser in den Vergleichszylinder, setzt 2 ccm des Ferrosulfatreagens — eine frisch bereitete Lösung von 0,1 g Ferrosulfat und 0,5 g Kalium-natriumtartrat in 100 ccm Wasser — hinzu, ergänzt auf 100 ccm, mischt und vergleicht die Färbungen senkrecht und waagrecht mit der einer in gleicher Weise hergestellten Typlösung von 0,1 g reiner Gallussäure in 100 ccm Wasser. Sind die Färbungen ungleich, so läßt man von der dunkleren Lösung aus dem Zylinder soviel abfließen, bis die Färbungen gleich sind.

Bei der Berechnung auf Tannine ist zu berücksichtigen, daß in den Tanninen verschiedenen Ursprungs das Verhältnis von Didigalloylglucose und Digallussäureanhydrid ein verschiedenes ist und daher jedesmal durch Hydrolyse besonders ermittelt werden muß; bei dem von MITCHELL verwendeten Tannin war das Verhältnis von Gallussäure zu Tannin = 1:2,2. Nach diesem Verfahren läßt sich noch 0,1 mg Gallussäure in 100 ccm Lösung nachweisen.

Zur Bestimmung von Gallussäure und Tannin nebeneinander bestimmt man zunächst beide Stoffe zusammen in der obigen Weise und berechnet auf Gallussäure, dann fällt man das Tannin mit Chininhydrochlorid<sup>1</sup> und bestimmt im Filtrate die Gallussäure in gleicher Weise. Eine etwaige störende Einwirkung färbender Stoffe in der zu untersuchenden Lösung gleicht man durch Zusatz von Caramel zu der Vergleichslösung aus.

b) Verfahren mit Osmiumtetroxyd. Die in Gallussäure und Tannin vorhandene Pyrogallolgruppe verbindet sich mit Osmiumtetroxyd ( $OsO_4$ ) in verdünnten Lösungen zu einer rötlich violetten, in konz. Lösungen zu einer fast schwarzen Lösung. Es lassen sich auf diese Weise noch 0,05 mg Pyrogallol = 0,07 mg Gallussäure in 100 ccm Wasser bestimmen.

Als Reagens verwendet man eine 0,1%ige Lösung von Osmiumtetroxyd, von der man 1 ccm zu 1 ccm der zu untersuchenden und der Vergleichslösung in 100 ccm Wasser hinzusetzt. Die Färbung beobachtet man nach 5 Minuten. Im übrigen ist die Ausführung der Untersuchung und auch das Verfahren zur Bestimmung von Gallussäure und Tannin nebeneinander, das gleiche wie bei a).

6. Sonstige Verfahren. Von den zahlreichen sonstigen Verfahren seien hier noch folgende genannt: a) Fällung als Chinintannat nach R. R. TATLOCK und R. T. THOMSON<sup>2</sup>. — b) Fällung mit Nickelhydroxyd nach P. SINGH<sup>3</sup>. — c) Titration mit Jod nach F. T. LEE<sup>4</sup>. — d) Fällung mit Wismutnitrat nach M. HIRSCH<sup>5</sup>. — e) Titration mit Titantrichlorid nach S. KRISHNA und N. RAM<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Vgl. R. R. TATLOCK u. R. T. THOMSON: *Analyst* 1910, **35**, 103; *Z.* 1911, **22**, 531.

<sup>2</sup> R. R. TATLOCK u. R. T. THOMSON: *Analyst* 1910, **35**, 103; *Z.* 1911, **22**, 531.

<sup>3</sup> P. SINGH: *Zeitschr. analyt. Chem.* 1919, **58**, 373.

<sup>4</sup> F. JEAN: *Ann. Chim. analyt. appl.* 1900, **5**, 134; *C.* 1900, **I**, 1107. — BAUDET: *Bull. Soc. chim. Paris* 1906 [3], **35**, 760; *C.* 1906, **II**, 1291. — E. T. LEE: *Journ. Amer. Leather Chemists Assoc.* 1919, **14**, 114; *C.* 1919, **IV**, 304.

<sup>5</sup> M. HIRSCH: *Chem.-Ztg.* 1927, **51**, 718.

<sup>6</sup> S. KRISHNA u. N. RAM: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1928, **61**, 771.

# Farbstoffe.

Von

Professor **DR. A. BÖMER** und **DR. O. WINDHAUSEN** - Münster i. W.

Der Nachweis der natürlichen Farbstoffe der Lebensmittel oder von fremden natürlichen oder künstlichen Farbstoffen, die den Lebensmitteln zugesetzt sind, kann auf chemischem oder spektroskopischem Wege geführt bzw. zu führen versucht werden. Beide Verfahren sind aber noch wenig vollkommen und führen daher hinsichtlich des Nachweises der einzelnen fremden Farbstoffe nur in seltenen Fällen zu sicheren Ergebnissen; dagegen läßt die Gruppe der fremden Teer- (Anilin-) Farbstoffe neben natürlichen Farbstoffen sich meist zuverlässig nachweisen. Immerhin empfiehlt es sich aber, auch bei diesen mehrere der nachfolgenden Verfahren nebeneinander anzuwenden, um zu sicheren Ergebnissen zu gelangen.

Besondere Schwierigkeiten bietet aber die Bestimmung der Menge der fremden Farbstoffe in Lebensmitteln, zumal die zugesetzten Farbstoffmengen infolge des starken Färbungsvermögens, namentlich der Teerfarbstoffe, meist nur sehr klein sind. Man begnügt sich daher in der Regel lediglich mit dem Nachweise fremder Farbstoffe.

Nur bei der Untersuchung der Farbstoffe selbst kann ein Nachweis der einzelnen Farbstoffe in Frage kommen, um beurteilen zu können, ob die Farbstoffe zum Färben von Lebensmitteln zulässig sind oder wegen ihrer Giftigkeit zum Färben von Lebensmitteln nicht in Frage kommen. Immerhin bestehen aber auch hierbei insofern große Schwierigkeiten, weil die Zahl der künstlichen Farbstoffe von den einzelnen Farbentönen eine sehr große ist, auch die Benennungen der einzelnen Farben vielfach Verschiedenheiten aufweisen und ständig neue Farbstoffe hinzukommen.

## I. Chemischer Nachweis von Farbstoffen.

### A. Nachweis von Farbstoffgruppen.

Meistens handelt es sich bei der Untersuchung der Lebensmittel auf fremde Farbstoffe nur um den Nachweis von Farbstoffgruppen, d. h. um den Nachweis von künstlichen (Teer-) Farbstoffen einerseits und natürlichen fremden Farbstoffen andererseits. Hierfür kommen vorwiegend folgende Verfahren zur Anwendung.

#### 1. Ausfärbeverfahren.

Die Verfahren beruhen darauf, daß sich die künstlichen organischen Farbstoffe auf reine Wollfaser niederschlagen und durch Wasser nicht wieder ausgewaschen werden können, während die natürlichen Pflanzenfarbstoffe die Fasern gar nicht oder nur schwach färben und durch Wasser wieder ausgewaschen werden können.

a) Nach **N. ARATA**<sup>1</sup> verfährt man, wie folgt: 50—100 ccm der Farbstofflösung — gefärbte Flüssigkeiten können direkt angewendet werden, aus festen

<sup>1</sup> N. ARATA: Zeitschr. analyt. Chem. 1889, 28, 639.

Stoffen werden durch Wasser, Äthyl- oder Amylalkohol usw. Lösungen hergestellt<sup>1</sup> — werden 10 Minuten mit 5—10 ccm einer 10%igen Kaliumbisulfatlösung und 3—4 Fäden weißer, entfetteter sowie mit Alaun und Natriumacetat gebeizter Wolle in einer Porzellanschale oder einem Becherglase gekocht, die Fäden herausgenommen und mit Wasser gewaschen. Beim Vorhandensein von Teerfarbstoffen sind und bleiben die Fasern mehr oder weniger stark gefärbt und können zu weiteren Reaktionen verwendet werden. Behandelt man z. B. die ausgewaschene, rot gefärbte Wolle mit Ammoniak, so bleibt sie, wenn ein Teerfarbstoff vorliegt, entweder rot oder nimmt eine gelbliche Farbe an, die nach dem Auswaschen des Ammoniaks wieder in Rot übergehen kann. Bei Rotweinfarbstoff dagegen geht die an sich schwachrote Farbe der Wolle durch Behandlung mit Ammoniak in ein schmutziges, grünliches Weiß über.

Oder man wäscht die Wolle mit verd. Weinsäure aus, behandelt um etwa vorhandene Pflanzenfarbstoffe zu zerstören, kurze Zeit auf dem Wasserbade mit Quecksilberchloridlösung (1:9) und löst den in der Wolle fixierten Farbstoff entweder mit Schwefelsäure oder mit Äthylalkohol und Essigsäure wieder auf und prüft das Verhalten der Lösung noch gegen Alkali, Zinkstaub oder spektroskopisch. Die spektroskopische Untersuchung kann wertvolle Aufschlüsse über die Natur des Farbstoffs bringen (vgl. unten S. 1200).

Statt der in vorstehender Weise behandelten Wollfaser kann auch Baumwolle, die mit Tannin, Ferrihydroxyd oder Aluminiumhydroxyd gebeizt wird, verwendet werden.

Bei der Ausfärbung der Farbstoffe ist weiter zu berücksichtigen, daß basische Teerfarbstoffe sich nur in basischem oder neutralem Bade, die Säurefarbstoffe sich nur in saurem Bade auf Wolle niederschlagen. Man nimmt daher die Ausfärbung zweckmäßig sowohl im neutralen bzw. basischen als auch im sauren Bade vor.

Nach A. DE KROES und A. RECLAIRE<sup>2</sup> liefert das Ausfärbeverfahren nach ARATA nach dem Umfärben bessere Ergebnisse als nach einmaligem Ausfärben.

b) Nach CH. H. LA WALL<sup>3</sup>. Zu 100 ccm Farbstofflösung werden 5 ccm Salzsäure (10%) gegeben und in dieser Mischung wird ein etwa 1 × 4 Zoll großes Stück entfetteten Wollschleiers 1 Stunde lang gekocht. Wenn nach dem Abwaschen und Trocknen auf dem Gewebe eine deutliche Färbung sichtbar bleibt, wird es zur Lösung des fixierten Farbstoffs mit verd. Ammoniak behandelt. Diese Lösung wird dann mit Salzsäure (10%) leicht angesäuert und mit einem neuen Stück des Gewebes 1 Stunde lang gekocht. Bei keinem der Fruchtfarbstoffe wird eine zweite Färbung der Wolle erhalten; bei der ersten stellt sich gewöhnlich eine leichte schmutzige Färbung heraus. Die anderen Pflanzenfarbstoffe färben zum Teil beim ersten Versuche die Wolle ganz deutlich, nicht jedoch bei der zweiten Ausfärbung. Bei den roten Farbstoffen wird in allen Fällen die zum ersten Male gerötete Wolle beim Betupfen mit Ammoniak purpurrot (Unterschied von den Teerfarbstoffen). Die gelben Farbstoffe zeigen kein einheitliches Verhalten; die meisten bleiben mit Ammoniak unverändert oder werden etwas dunkler, nur Gelbholz erteilt bei der ersten Ausfärbung der Wolle eine hellgelbe Farbe, die mit Ammoniak in Rosarot umschlägt. Die Teerfarbstoffe geben bei der zweiten Ausfärbung der Wolle eine Farbe von derselben Intensivität, wie bei der ersten; Ammoniak verursacht keine Veränderung.

Das Verhalten der pflanzlichen Farbstoffe gegen Kaolin und ähnliche Entfärbungsmittel ist ganz verschieden. Naszierender Wasserstoff — dargestellt durch Einwirkung von Salzsäure auf Zink — und andere Reduktionsmittel, wie Zinnchlorür, bleiben ohne

<sup>1</sup> Da sich die Farbstoffe nur aus wässriger Lösung auf die Faser niederschlagen lassen, so müssen alkoholische Auszüge erst von dem Lösungsmittel befreit und der Rückstand muß wieder in Wasser gelöst werden. Löst sich der Farbstoff nicht in Wasser, so kann er auch nicht ausgefärbt werden.

<sup>2</sup> A. DE KROES u. A. RECLAIRE: Chem. Weekbl. 1928, 25, 525.

<sup>3</sup> CH. H. LA WALL: Amer. Journ. Pharm. 1905, 77, 301; Z. 1906, 11, 751.

Wirkung auf die reinen Fruchtfarbstoffe, während einige von den anderen Pflanzenfarbstoffen dadurch erheblich verändert oder ganz zerstört werden. Die untersuchten Teerfarbstoffe werden vollständig entfärbt, es ist indes zu beachten, daß sich auch unreduzierbare synthetische Farbstoffe im Handel befinden.

L. M. TOLMAN<sup>1</sup> hebt hervor, daß Orseille und andere Flechtenfarbstoffe bei dieser Probe sich ebenso verhalten wie Teerfarbstoffe, also auch beim zweiten Ausfärben sich auf der Wolle niederschlagen. Man soll die ausgefärbte Wolle, wenn man Orseille vermutet, mit Ammoniak behandeln und die ammoniakalische Lösung mit Amylalkohol ausschütteln, wodurch im Gegensatz zu den natürlichen Fruchtfarbstoffen die Flechtenfarbstoffe mit purpurroter Farbe gelöst werden. Man kann den Amylalkoholauszug weiter auf dem Wasserbade eindampfen, mit Wasser aufnehmen, die wäßrige Lösung mit Zinn und Salzsäure reduzieren und mit Eisenchlorid wieder oxydieren. Hierbei werden alle Azofarbstoffe, die nur als Ersatz für Flechtenfarbstoffe dienen können, zersetzt, während die letzteren erhalten bleiben.

c) Nach E. SPAETH<sup>2</sup> zieht man auf künstliche Farbstoffe zu prüfende Lebensmittel mit Natriumsalicylatlösung aus und verfärbt, wie folgt:

Man zieht die zu prüfende Substanz mit wäßriger Natriumsalicylatlösung (5%)  $\frac{1}{2}$  Stunde im siedenden Wasserbade aus, filtriert, erhitzt im Filtrat nach Zusatz von einigen Kubikzentimetern verd. Schwefelsäure einige entfettete Wollfäden  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde im siedenden Wasserbade und wäscht die Fäden zuerst mit Wasser und dann mit Alkohol aus. Sind künstliche Farbstoffe vorhanden, so ist die Wolle mehr oder weniger stark gefärbt.

## 2. Ausschüttelung der Farbstofflösung mit Äther und Amylalkohol.

a) Ausschüttelung mit Äther. Da einige Teerfarbstoffe in Äther löslich sind, so kann man sie von natürlichen Pflanzenfarbstoffen in der Weise trennen, daß man die Flüssigkeiten (etwa 100 ccm) mit Äther (etwa 30 ccm) in einem Zylinder von etwa 150 ccm Inhalt durchschüttelt und eine zweite Probe nach vorherigem Zusatz von 5 ccm Ammoniak in derselben Weise behandelt. Von den ätherischen Schichten hebt man mit einer Pipette 20 ccm klar ab, verdunstet den Äther, ohne zu filtrieren<sup>3</sup>, über einem 5 ccm langen Wollfaden. Die an den Rändern des Schälchens sich abscheidenden Teile des Verdunstungsrückstandes löst man durch vorsichtiges Umschwenken in dem noch nicht verdunsteten Äther wieder auf. Wird der Wollfaden nach dem Verdunsten des Ätherauszuges der mit Ammoniak übersättigten Probe rot gefärbt, so sind Teerfarbstoffe vorhanden. Rührt die rote Färbung von natürlichen Pflanzenfarbstoffen her, so erscheint der Wollfaden, z. B. bei Rotwein, rein weiß, während er nach Verdunsten des Ätherauszuges der ursprünglichen, nicht mit Ammoniak versetzten Probe mehr oder weniger mißfarbig erscheint.

Auf diese Weise lassen sich nach HASTERLICK<sup>4</sup> Fuchsin, Safranin und Chrysoidin (z. B. im Rotwein) nachweisen; für andere Anilinfarbstoffe wie Säurefuchsin (Rosanilinsulfosaures Natrium) und viele Azofarbstoffe liefert das Verfahren keine positiven Ergebnisse.

b) Ausschüttelung mit Amylalkohol. Auch der Amylalkohol löst verschiedene Teerfarbstoffe und wird besonders zum Nachweise der letzteren im Rotwein mitverwendet. Man durchschüttelt zu dem Zweck je 100 ccm der ursprünglichen, der mit Schwefelsäure angesäuerten und der mit Ammoniak übersättigten Flüssigkeit (Wein) mit je 30 ccm Amylalkohol und befördert die Trennung der Schichten, wenn nötig, durch Zentrifugieren.

<sup>1</sup> L. M. TOLMAN: Journ. Amer. Chem. Soc. 1905, 27, 25; Z. 1906, 11, 63.

<sup>2</sup> E. SPAETH: Z. 1901, 4, 1020; Pharm. Zentralh. 1897, 38, 884; 1903, 44, 117.

<sup>3</sup> Durch vorherige Filtration können kleine Mengen Farbstoff, z. B. Fuchsin, in dem Filter zurückgehalten werden.

<sup>4</sup> HASTERLICK: Mitt. Pharm. Inst. u. Labor. angew. Chem. Erlangen 1889, H. 2, 51.

$\alpha$ ) Ist der amyalkoholische Auszug der mit Ammoniak übersättigten Flüssigkeit rot gefärbt, so sind basische Teerfarbstoffe vorhanden. Man hebt dann den klaren Amylalkohol ab, verdampft ihn unter Zusatz von etwas Essigsäure auf dem Wasserbade und kann mit dem Rückstand weitere Reaktionen zur Feststellung des Farbstoffes vornehmen.

$\beta$ ) Der amyalkoholische Auszug des mit Schwefelsäure angesäuerten Anteiles der Flüssigkeit enthält neben den künstlichen Säurefarbstoffen auch die natürlichen Pflanzenfarbstoffe wie z. B. von Wein. Um letztere zu entfernen, wird der von der unteren Flüssigkeit abgehobene Amylalkohol mit dem gleichen Volumen Wasser und dann tropfenweise mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Die natürlichen Pflanzenfarbstoffe werden durch den Ammoniakzusatz grün bis grünbraun verfärbt, während die vorhandenen Teerfarben unverändert (z. B. rot) bleiben und beim Schütteln in das unter dem Amylalkohol befindliche Wasser übergehen. Letzteres wird zur Trockne eingedampft und der so erhaltene Rückstand kann zu besonderen Reaktionen verwendet werden.

$\gamma$ ) Ist der amyalkoholische Auszug der ursprünglichen, d. h. nicht mit Ammoniak oder Schwefelsäure versetzten Flüssigkeit rot gefärbt, so können Teerfarbstoffe, aber auch natürliche Pflanzenfarbstoffe vorhanden sein. Man trennt letztere alsdann in derselben Weise wie unter  $\beta$ ) von den Teerfarbstoffen. Durch dieses Verfahren lassen sich auch Säurefuchsin und die Azofarbstoffe nachweisen.

c) **Entmischung von Äthyl-Amylalkohollösungen durch Wasserzusatz.** Ein Verfahren von J. J. HOFMAN<sup>1</sup> beruht darauf, daß sich Gemische gleicher Teile Äthyl- und Amylalkohol (auch Äthyl- und Benzylalkohol und von 1 Tl. Benzol und 10 Tln. Aceton) beim Verdünnen mit mehr als 5 Tln. Wasser in zwei Phasen teilen, wobei natürliche Farbstoffe sich in der wäßrigen (unteren) Phase finden, während die oberen Phasen meist farblos sind. Künstliche Farbstoffe sind stets in der oberen, vielfach aber in beiden Phasen vorhanden. Ferner zeigen sich Farbunterschiede, je nachdem die Flüssigkeit neutral, sauer oder alkalisch ist oder Reduktions- oder Oxydationsmittel zugesetzt worden sind.

### 3. Fällung mit Bleiessig.

Man versetzt 100 ccm gefärbte Flüssigkeit mit etwa 30 ccm Bleiessig, erwärmt die Mischung schwach, schüttelt gut um und filtriert. Ist das Filtrat gefärbt, so können basische Teerfarbstoffe vorhanden sein; da aber nicht sämtliche natürlichen Pflanzenfarbstoffe durch Bleiessig gefällt werden, sondern das Filtrat ebenfalls färben, so behandelt man zum sicheren Nachweise von Teerfarbstoffen das Filtrat nach 2b mit Amylalkohol. Da durch Bleiessig ferner nur die basischen Teerfarbstoffe angezeigt werden, so muß zum Nachweise von Säure- oder Azofarbstoffen noch die folgende, die sog. CAZENEUVESche Probe mit gefälltem gelben Quecksilberoxyd durchgeführt werden.

### 4. Behandlung mit Quecksilberoxyd.

Nach P. CAZENEUVE<sup>2</sup> werden 10 ccm Flüssigkeit in der Kälte mit 0,2 g gefälltem gelbem Quecksilberoxyd 1 Minute lang geschüttelt und nach dem Absitzen durch ein 3—4faches angefeuchtetes Filter filtriert; in derselben Weise wird eine zweite Probe von Flüssigkeit mit 0,2 g gelbem Quecksilberoxyd einmal aufgekocht und dann 1 Minute lang geschüttelt. Nach dem vollständigen Absitzen des Quecksilberoxyds wird die Flüssigkeit durch ein 3—4faches Filter filtriert. Erscheint dieses Filtrat trübe, so ist das ein Zeichen, daß zu wenig

<sup>1</sup> J. J. HOFMAN: Pharm. Weekbl. 1928, 65, 1190.

<sup>2</sup> P. CAZENEUVE: Compt. rend. Paris 1886, 102, 51.

geschüttelt oder aufgekocht oder absitzen gelassen wurde; der Versuch muß dann wiederholt werden. Die etwaige trübe Beschaffenheit des Filtrats ist keineswegs die Folge einer Farbfälschung. Ein klares, aber gefärbtes Filtrat ist dagegen für den Nachweis von Teerfarben beweisend. Ist das Filtrat farblos, so können aber doch noch Teerfarbstoffe vorhanden sein; denn einige Teerfarbstoffe, z. B. Erythrosin, Eosin und einige blaue Teerfarbstoffe, werden ebenso wie natürliche Pflanzenfarbstoffe durch Quecksilberoxyd zurückgehalten.

Dagegen können auf diese Weise mit Sicherheit erkannt werden: Säurefuchsin, Bordeauxrot B, Roccelinrot, Purpurrot, Crocein BBB, Ponceau BB, Orange R, RR, RRR, Orange II, Tropäolin M, Tropäolin II, Kongorot, Amaranrot, Cochenilleextrakt I, 2B, Benzopurpurin, Biebricher Scharlach und Heßpurpur. Einige andere Teerfarbstoffe, z. B. Safranin, Chrysoidin, Chrysoin, Methyleosin, Rot I, Rot NN, Ponceau RR, werden von dem Quecksilberoxyd zum Teil zurückgehalten und können daher, wenn sie nur in geringer Menge vorhanden sind, dem Nachweise entgehen.

Statt fertig gebildetes gelbes Quecksilberoxyd anzuwenden, verfährt man auch in folgender Weise: 10 ccm Flüssigkeit werden mit 10 ccm einer kaltesättigten Quecksilberchloridlösung geschüttelt, sodann mit 10 Tropfen Kalilauge (Spez. Gewicht 1,27) versetzt, wieder geschüttelt und durch ein trockenes Filter filtriert.

### 5. Bestimmung der elektrolytischen Leitfähigkeit.

Zur Unterscheidung von natürlichen und künstlichen Farbstoffen wenden G. W. CHLOPIN und P. J. WASSILJEWA<sup>1</sup> die Bestimmung der elektrolytischen Leitfähigkeit an. Die natürlichen pflanzlichen und tierischen Farbstoffe besitzen eine geringere Leitfähigkeit als die künstlichen (Teer-) Farbstoffe, welche meist einen weniger komplizierten Bau mit mehr oder weniger deutlich ausgeprägten basischen oder sauren Eigenschaften aufweisen oder salzartige Verbindungen darstellen. Man stellt wäßrige oder alkoholische Lösungen der Farbstoffe her und bestimmt die Leitfähigkeit.

Der Widerstand, in „Ohm“ ausgedrückt, war in wäßriger Lösung, wenn der der künstlichen Farbstoffe = 1 gesetzt wurde, bei Cochenille und Catechu 4—22mal so groß und in alkoholischer Lösung bei Catechu, Quercitin, Orlean und Safran 6—40 mal so groß wie bei Pikrinsäure, Naphtholgelb, Auramin, Azoflavin und Chrysoidin.

## B. Nachweis natürlicher Farbstoffe.

In diesem Abschnitt wird der Nachweis der Reinheit der Farben von natürlich gefärbten Lebensmitteln, z. B. Fruchtsäften, behandelt, ferner der Nachweis fremder natürlicher Farbstoffe, soweit solche zur Auffärbung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen und zu kosmetischen Zwecken Verwendung finden.

Nicht behandelt werden dagegen diejenigen Farbstoffe, welche lediglich zum Färben von Gespinsten und Papieren sowie als Malerfarben verwendet werden.

Angaben über Vorkommen, Zusammensetzung und Konstitution der verschiedenen natürlichen Farbstoffe finden sich in Bd. I, S. 569—636.

In früheren Zeiten wurden zum Auffärben von Lebensmitteln fast ausschließlich natürliche pflanzliche Farbstoffe verwendet. Heute sind diese fast vollständig durch die viel ausgiebigeren und reineren künstlichen (Teer-) Farbstoffe verdrängt.

Im nachfolgenden seien die wichtigsten, auch heute noch zum Auffärben natürlich gefärbter Lebensmittel sowie zu kosmetischen Zwecken dienenden

<sup>1</sup> G. W. CHLOPIN u. P. J. WASSILJEWA: Z. 1913, 25, 596.

natürlichen Farbstoffe, nach Farbgruppen geordnet, zusammengestellt. Im Anschlusse daran werden die Verfahren zum Nachweise der Farbstoffe, soweit solche Verfahren bekannt sind, behandelt. Diese Verfahren beruhen meist auf der verschiedenen Löslichkeit der Farbstoffe sowie auf den Farbänderungen, welche bei Zusatz von Mineralsäuren, Laugen und Salzlösungen entstehen.

Über den spektroskopischen Nachweis siehe S. 1200.

### 1. Rote Farbstoffe.

Die wichtigsten natürlich rot gefärbten Lebensmittel sind Früchte und Zubereitungen daraus, Rotwein, Rote Rüben und Tomaten.

**a) Auffärbung.** Zur Auffärbung der von Natur schwach gefärbten oder zu stark verdünnten Produkte dienen außer den durch ihre starke Färbung ausgezeichneten Säften und Marmeladen von sog. schwarzen Kirschen, Heidelbeeren, Brombeeren und Hollunderbeeren, sowie zu kosmetischen Zwecken, noch folgende natürlichen roten Farbstoffe:

α) *Alcanna* (Bd. I, S. 589) mit dem violettroten Farbstoff *Alcannin* wird zu kosmetischen Zwecken verwendet.

β) *Kermesbeere*. Beeren der in tropischen Gegenden einheimischen, in Südfrankreich und Portugal eingebürgerten *Phytolacca decandra* L. Der rotgefärbte Saft dient vielfach zum Auffärben von Rotwein; auch stellt man aus den Beeren eine rote Schminke her.

γ) *Sandelholz* ist das Stammholz von *Pterocarpus santalinus* und *indicus* (Familie der *Dalbergien*), in Ostindien, Ceylon, Timor und an der Koromandelküste gedeihend. *Camwood* und *Barwood* stammen von *Baphia nitida* (Westküste von Afrika). Der Farbstoff des Sandelholzes ist das *Santalin*; es ist ein schokoladefarbiges Pulver, das bei 243° erweicht und bei 250—260° sich zersetzt. In Wasser ist es schwer löslich, in Alkohol, Äther und Essigsäure mit blutroter Farbe leicht löslich. Mit Natronlauge entsteht eine dunkelrote Färbung, mit alkoholischer Bromwasserstoffsäure eine carminrote Lösung, mit alkoholischer Eisenchloridlösung eine violette Färbung. *Camwood* enthält neben *Desoxysantal* ein Isomeres von *Santal*, das *Isosantal*. *Desoxysantal* ist ein lebhaft rotes Pulver, in Äther mit grüner Fluorescenz löslich, in Alkohol orangebraune Lösung. Mit Natronlauge entsteht eine scharlachrote Lösung, mit alkoholischer Bromwasserstoffsäure eine scharlachrote Lösung, mit alkoholischer Eisenchloridlösung eine rotbraune Lösung. Lacke werden aus dem alkalischen Auszug von Sandelholz durch Füllen mit Alaun (ziemlich feuriges Purpurbraun), mit Magnesiumsalzen (dunkelbraun, fast violett), mit Zinksalzen (violettbraun), mit Zinnsalzen (lila), mit Bleisalzen (rotviolett), mit Kupfersalzen (violettbraun) und mit Eisensalzen (braungelb) erhalten<sup>1</sup>.

Sandelholz dient zum Färben von Feinbäckereiwaren und Likören.

δ) *Malvenblüten*. Wilde Malven enthalten *Malvidin* als *Malvinglucosid* in den violetten Blüten.

ε) *Klatschmohn* enthält den Farbstoff *Cyanidin* als *Cyanin*.

ζ) *Rote Rüben* (*Rote Beten*, *Beta vulgaris* L. var. *hortensis*) enthalten *Betanin*, ein stickstoffhaltiges *Anthocyan*.

η) Auch gewisse *Krapp-Farbstoffe* (Bd. I, S. 591) sollen gelegentlich zum Färben von Getränken Verwendung finden.

**b) Nachweis der Farbstoffe.** Der chemische Nachweis der einzelnen natürlichen roten Farbstoffe bietet große Schwierigkeiten; man wird daher nur selten in der Lage sein, die einzelnen Farbstoffe sicher zu erkennen, da sie in ihrem Verhalten gegen Reagenzien große Ähnlichkeiten aufweisen. Einen Überblick hierüber gibt die Tabelle 1 auf S. 1184.

Zur Isolierung von *Anthocyanen* (*Cyanidin*, *Malvidin*, *Betanin* usw.) und anderen basischen Farbstoffen haben R. WILLSTÄTTER und G. SCHUDEL<sup>2</sup> ein Verfahren ausgearbeitet. Die in Wasser leicht löslichen, in Äther unlöslichen Farbstoffe lassen sich mit Hilfe von *Pikrinsäure* und *Dichlorpikrinsäure* aus wäßrigen Lösungen in organische Lösungsmittel überführen. Die *Anthocyane* unterscheiden sich bei Zusatz von *Pikrinsäure* zur Lösung

<sup>1</sup> Vgl. auch A. A. WILSON u. J. N. BENNET (*Pharmac. Journ.* 1928, 120, 582) über Farbreaktionen des *Blauholzes*, *Sappenholzes* und *Sandelholzes* mit *Bleiacetat*. Ferner L. SOEP (*Analyst* 1927, 52, 696).

<sup>2</sup> R. WILLSTÄTTER u. G. SCHUDEL: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1918. 51, 782.



Tabelle 1. Verhalten natürlicher roter  
(Aus „Bibliothek der gesamten Lebensmittel-

| Nr. | Säfte von                    | Amylalkohol-<br>auszug |                             | Bleiessig                |                   | Blei-<br>hydroxyd                      | Ferro-<br>sulfat                 | Alu-<br>minium-<br>acetat<br>+<br>Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |
|-----|------------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|--|----------------------------------|---|
|     |                              | direkt                 | sauer                       | Fällung                  | Filtrat           |  |                                  |   |
| 1   | Kirschen                     | —                      | —                           | blau-<br>grau            | bläu-<br>lich     | rötlich                                | rötlich                          | grau  |
| 2   | Himbeeren                    | —                      | schwach<br>gelblich         | „                        | blau-<br>grau     | Filtrat:<br>rötlich                    | „                                | „   |
| 3   | Johannisbeeren               | —                      | —                           | „                        | —                 | rötlich-<br>gelb                       | „                                | „   |
| 4   | Brombeeren                   | rötlich                | gelbrot                     | blau-<br>grün            | —                 | grün-<br>grau                          | „                                | grau-<br>blau   |
| 5   | Heidelbeeren                 | rot-<br>violett        | „                           | dunkel-<br>blau-<br>grün | grün-<br>lich     | grau-<br>grün                          | rot-<br>violett                  | „   |
| 6   | Hollunderbeeren              | rötlich                | „                           | blau-<br>grün            | bläu-<br>lichgrün | grün-<br>grau                          | blau-<br>violett                 | „   |
| 7   | Kermesbeeren<br>(Phytolacca) | —                      | schwach<br>bläu-<br>lichrot | rot-<br>braun            | ent-<br>färbt     | fleisch-<br>rot<br>Filtrat:<br>gelbrot | nicht<br>kenn-<br>zeich-<br>nend | rot-<br>violett   |
| 8   | Mohnblüten                   | rot                    | rot                         | blau-<br>grün            | —                 | grau-<br>grün                          | kaum<br>entfärbt                 | grau  |
| 9   | Malvenblüten                 | violett-<br>rot        | „                           | grün                     | —                 | grün                                   | stark<br>blau-<br>violett        | blau-<br>grün   |
| 10  | Roten Rüben                  | —                      | —                           | rot-<br>gelb             | orange-<br>gelb   | fleisch-<br>farben                     | nicht<br>kenn-<br>zeich-<br>nend | violett-<br>rot   |
| 11  | Alcanna <sup>2</sup>         | rot                    | rot                         | blau <sup>2</sup>        | —                 | bläu-<br>lich                          | bläu-<br>lichgrau                | grau-<br>blau   |

<sup>1</sup> In saurer Lösung sind sämtliche Farbstoffe rot. — Mit Quecksilberchlorid bei Mohnblüten nicht ganz. — Natriumphosphat entfärbt sämtliche Lösungen außer denen

<sup>2</sup> Der Alcannafarbstoff ist in Äther, Essigäther und Chloroform in neutraler, saurer

der Chloride in ihrer Verteilung folgendermaßen: Anthocaynidine (Cyanidin) gehen aus wäßriger Lösung mit Pikrinsäure quantitativ in Äther über. Monoglucoside (wie Chrysanthemine) und Diglucoside (wie Cyanin) gehen auch mit Pikrinsäure nicht in Äther über.

## 2. Gelbe Farbstoffe<sup>1</sup>.

Eines der wichtigsten natürlich gelb gefärbten Lebensmittel ist das Eigelb<sup>2</sup>; es werden daher auch andere Lebensmittel, wie Teig- und Backwaren, denen

<sup>1</sup> Zu den natürlichen gelben Farbstoffen gehört auch das Gummigutt (Bd. I, S. 626), dessen Verwendung bei Lebensmitteln, da es giftig ist, durch das Farbensgesetz vom 5. Juli 1887 ausdrücklich verboten ist. Da Gummigutt nur als Aquarellfarbe und Lack verwendet wird, zum Färben von Lebensmitteln auch wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser, Alkohol und Äther kaum Verwendung finden kann, soll es hier nicht näher behandelt werden. Über seinen Nachweis siehe E. HIRSCHSOHN: Zeitschr. analyt. Chem. 1891, **30**, 655 und L. GRÜNHUT: Zeitschr. öffentl. Chem. 1898, **4**, 563; **Z.** 1899, **2**, 538.

<sup>2</sup> Im Sommer ist auch das Butterfett natürlich gelb gefärbt; hierüber siehe Bd. IV.

Pflanzenfarbstoffe gegen Reagenzien<sup>1</sup>.  
Industrie“ Bd. 6, Leipzig 1914 [Dr. MAX JÄNECKE].)

| Am-<br>moniak-<br>alaun          | Am-<br>moniak     | Natrium-<br>carbonat | Kali-<br>lauge            | Calcium-<br>carbonat                      | Magnesium-    |                 | Bemerkungen  |
|----------------------------------|-------------------|----------------------|---------------------------|---|---------------|-----------------|--|
|                                  |                   |                      |                           |   | oxyd          | carbonat        |  |
| hellrot                          | grün-<br>braun    | bräunlichgrün        |                           | grau-<br>rötlich                          | blaugrau      |                 | Bemerkenswert ist das Verhalten der verdünnten Säfte beim Schütteln mit Tonerdehydrat  |
| „                                | braun             | braun                |                           | grau                                      | graugrünlich  |                 |  |
| „                                | gelb-<br>grün     | gelbgrün             |                           | gelblich<br>orange                        | grau          |                 |  |
| violett                          | grün-<br>lichgelb | grün                 |                           | grau-<br>grünlich                         | graugrünlich  |                 |  |
| violett-<br>rot                  | gelb-<br>grün     | dunkelgrün           |                           | schiefer-<br>grau<br>Filtrat:<br>grünlich | grün          |                 |  |
| „                                | grün              | grün                 |                           | grau-<br>rötlich                          | grünblau      |                 |  |
| nicht<br>kenn-<br>zeich-<br>nend | gelb              | violett              | gelb                      | Filtrat:<br>rot                           | gelb-<br>lich | violett         | Auf Wolle etwas aus-<br>färbbar. Capillaranalyse:<br>Mehrere rote Streifen.            |
| stark<br>rot                     | braun-<br>grün    | gelb-<br>braun       | gelb-<br>grün             | rötlich-<br>grau                          | grau          |                 | Bemerkenswert ist das Verhalten der verdünnten Säfte beim Schütteln mit Tonerdehydrat. |
| blau-<br>violett                 | grün              | grün                 |                           | grau<br>Filtrat:<br>grün                  | grün          | grün            |  |
| nicht<br>kenn-<br>zeich-<br>nend | gelb-<br>braun    | violett-<br>rot      | gelb bis<br>gelb-<br>grün | Filtrat:<br>rot                           | gelblich      | rot-<br>violett | Capillaranalyse: Breiter<br>roter Streifen   |
| rot-<br>violett                  | blau <sup>2</sup> |                      |                           | blau                                      | —             | blau            | Aus saurer und alkali-<br>scher Lösung auf Wolle<br>ausfärbbar.                        |

werden sämtliche Lösungen außer Alcannalösung entfärbt; bei Kermesbeeren langsamer, der Kermesbeeren und roten Rüben; Alcannalösung wird violett gefärbt. und ammoniakalischer Lösung mit roter Farbe löslich.

Eigelb zugesetzt ist und die durch das Lutein (Bd. I, S. 575) des Eigelbs eine mehr oder weniger gelbe Färbung annehmen, als besonders hochwertig angesehen, und andererseits wird die gelbe Farbe eines Lebensmittels als Maßstab für seinen Eigehalt angesehen. Es ist daher erklärlich, daß gerade die Auffärbung natürlich gelb gefärbter Lebensmittel seitens der Hersteller sehr häufig erfolgt. Hierfür steht eine Reihe von natürlichen Auffärbemitteln zur Verfügung, insbesondere kommen folgende in Betracht:

a) Safran (Bd. I, S. 581 und Bd. VI, S. 375) für Backwaren, bei denen es gleichzeitig auch als Gewürz dient.

b) Safflor (Bd. I, S. 614) mit den beiden Farbstoffen Saflorgelb und Carthamin wird als Likörfarbe und zur Herstellung von Schminke in der Kosmetik verwendet.

c) Orlean (Bd. I, S. 582) mit dem Farbstoff Bixin wird in Öllösung zum Färben von Butter und Margarine und in alkalischer Lösung zum Färben von Käse verwendet. Bixin ist in Wasser unlöslich und in kaltem Alkohol nur wenig löslich, dagegen in fetten Ölen und Natronlauge leicht löslich. In konz. Schwefelsäure löst es sich mit kornblumenblauer Farbe.

d) Curcuma (Bd. I, S. 584, Bd. VI, S. 431). Der färbende Stoff, das Curcumin, ist in Wasser sehr schwer und in Alkohol schwer löslich; in Äther ist es mit grüner Fluoreszenz und in Alkalien mit rötlichbrauner Farbe löslich.

Zum Nachweise von Curcuma ist Borsäure (S. 1265) geeignet, mit der eine rote Verbindung entsteht, die mit Alkalien blau wird.

e) Möhrensaft (Bd. I, S. 570) mit dem Farbstoff Carotin, sowie der Auszug von Löwenzahnblüten (Bd. I, S. 579) mit dem Farbstoff Taraxanthin finden ebenfalls gelegentlich als Auffärbemittel Verwendung.

### Nachweis der Farbstoffe.

a) Nach A. R. LEEDS<sup>1</sup> versetzt man zur Erkennung der einzelnen gelben Farbstoffe je 2—3 Tropfen ihrer alkoholischen Lösung mit je 2—3 Tropfen konz. Schwefelsäure, konz. Salpetersäure, Schwefelsäure + Salpetersäure und konz. Salzsäure. Hierbei treten folgende Reaktionen ein:

Tabelle 2.

| Farbstoff                    | Der Farbstoff wird beim Zusatz von           |  |  |  |
|------------------------------|--|--|--|--|
|                              | konz. Schwefelsäure                          | konz. Salpetersäure                            | Schwefelsäure + Salpetersäure                              | konz. Salzsäure  |
| Safran                       | violett bis kobaltblau; rötlichbraun werdend | hellblau; hell rötlich-braun werdend           |  | gelb; schmutziggelb werdend                            |
| Orlean <sup>2</sup> (Anatto) | indigoblau; violett werdend                  | blau; farblos werdend                          |  | keine Veränderung; nur leicht schmutziggelb oder braun |
| Curcuma <sup>3</sup>         | violett                                      | violett  | violett  | violett <sup>4</sup>                                   |
| Möhre                        | umbrabraun                                   | entfärbt                                       | NO <sub>2</sub> -Dämpfe und Geruch nach verbranntem Zucker | nicht entfärbt   |
| Ringelblume                  | dunkelviolettblau-grün                       | blau; sofort in Schmutzig-gelb-grün übergehend | grün   | grün bis gelbgrün                                      |
| Künstliche Farbstoffe.       |  |  |  |  |
| Saflorgelb                   | hellbraun                                    | teilweise entfärbt                             | entfärbt   | keine Veränderung                                      |
| Anilingelb                   | gelb   | gelb   | gelb   | gelb   |
| Martiusgelb                  | hellgelb                                     | gelb; rötliche Fällung                         | gelb   | gelbe Fällung  |
| Victoriagelb                 | teilweise entfärbt                           |  |  | fuchsinrot <sup>5</sup>                                |

b) Reaktion auf Orlean. Nach L. DOKKUM<sup>6</sup> wird eine verd. Lösung des Farbstoffes in einem Reagensglase vorsichtig mit einem gleichen Volumen

<sup>1</sup> A. R. LEEDS: Analyst 1887, 12, 150; Chem.-Ztg. 1887, 11, Rep. 188.

<sup>2</sup> Aus Orlean durch Kochen mit Natronlauge (6%) und Ausschütteln mit Sesamöl erhalten.

<sup>3</sup> Curcuma wird durch Ammoniak rötlichbraun; beim Vertreiben des Ammoniaks kehrt die ursprüngliche Farbe zurück.

<sup>4</sup> Beim Verdampfen der Salzsäure kehrt die ursprüngliche Farbe wieder.

<sup>5</sup> Die gelbe Farbe kehrt beim Neutralisieren mit Ammoniak wieder.

<sup>6</sup> L. DOKKUM: Pharm. Weekbl. 1904, 41, 271; C. 1904, I, 1232.

Salpetersäure überschichtet. Bei Gegenwart von Orlean färbt sich die Trennungsfäche sofort stark blau. Die Farbe teilt sich alsdann der Salpetersäure mit, geht aber rasch in Grün über und gleichzeitig entsteht in der oberen Schicht eine rote Trübung.

### 3. Grüne Farbstoffe (Chlorophyll).

Zu den natürlich grün gefärbten Lebensmitteln gehört die Mehrzahl der Gemüsearten; diese verdanken ihre Färbung dem Blattgrün oder Chlorophyll (Bd. I, S. 629)<sup>1</sup>.

Das Blattgrün besteht aus einem konstanten Gemisch der vier Farbstoffe Chlorophyll a und b, Carotin und Xanthophyll. Normal grüne Pflanzen enthalten 0,7—1% Chlorophyll in der Trockensubstanz. — Chlorophyll ist in Benzol, Petroläther und Schwefelkohlenstoff unlöslich, in absol. Methyl- und Äthylalkohol, in absol. Aceton sowie in Äther und Chloroform schwer löslich. Man gewinnt es am besten durch Ausziehen des getrockneten Blattmehles mit 80%igem Aceton, 90%igem Äthyl- oder 66%igem Methylalkohol und reinigt es durch Behandeln des Extraktes mit Petroläther, wiederholtes Ausziehen mit Aceton (80%), Fällen mit Wasser, Ausziehen mit Methylalkohol (80%) usw. Durch Behandeln mit dem letzteren wird es von Carotin und Xanthophyll befreit, die darin löslich sind. — Rohchlorophyll von guter Beschaffenheit erhält man durch Ausfällen des Auszuges mit Aceton (80%) mit wenig Wasser und Umfällen aus Äther-Petroläther.

Seitdem mehr oder weniger reine Lösungen von Chlorophyll im Handel zu haben sind, dienen solche auch zum Auffärben von Gemüse, insbesondere von Gemüsekonserven, deren natürliche Farbe durch die Art der Zubereitung gelitten hat<sup>2</sup>.

a) **Nachweis.** *α)* Verdünnte Chlorophylllösungen zeigen eine eindeutige Fluorescenz nach Rot. Schüttelt man ätherische Chlorophylllösungen mit methylalkoholischer Kalilauge (30%), so tritt Braunfärbung ein, die nach einigen Minuten wieder in Grün übergeht. — Bei Zusatz von stärkeren Säuren schlägt die Farbe in Olivgrün um unter Bildung von Phaeophytin und Abscheidung von Magnesium; die Menge des letzteren beträgt 2,7%, entsprechend 4,5% Magnesiumoxyd des Chlorophylls.

*β)* Läßt man eine konz. methyl- oder äthylalkoholische Chlorophylllösung in dünner Schicht zwischen Glasplatten langsam verdunsten, so entstehen neben rötlichen Carotinoidkrystallen grün- bis blauschwarze Krystalle von Methyl- oder Äthylchlorophyllid. Diese Reaktion ist auch zum mikrochemischen Nachweis geeignet.

*γ)* Der spektroskopische Nachweis (S. 1204) ist am empfindlichsten; Chlorophylllösungen zeigen ein scharfes Band zwischen den Linien B und C des Spektrums.

b) **Bestimmung.** Die quantitative Bestimmung des Chlorophylls, die bei den Lebensmitteluntersuchungen wohl nur selten erforderlich sein wird, geschieht auf colorimetrischem Wege, indem man das gereinigte Chlorophyll am besten in das gut krystallisierende Äthylchlorophyllid überführt und die Färbung seiner Lösung mit der einer Lösung von 50 mg gereinigtem Chlorophyll in 100 ccm absol. Alkohol vergleicht.

<sup>1</sup> Vgl. auch den Artikel „Chlorophyll“ von A. TREIBS in G. KLEINs Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 3, S. 1351 (Berlin: Julius Springer 1932).

<sup>2</sup> Früher wurde die Auffärbung von Gemüsekonserven vielfach durch Kochen der Gemüse in Kupferkesseln oder durch Zusatz von etwas Kupfersulfat beim Kochen bewerkstelligt, wobei sich Kupferphyllocyanat bildet, das durch eine stark grüne Färbung ausgezeichnet ist.

### C. Nachweis von Caramel.

Zur Gelb- bzw. Braunfärbung von alkoholischen Getränken, Essig, Back- und Zuckerwaren wird vielfach Caramel<sup>1</sup> (Zuckercouleur) verwendet<sup>2</sup>. Für seinen Nachweis können folgende Verfahren dienen:

**1. Verfahren von C. AMTHOR<sup>3</sup>.** Es beruht darauf, daß das Caramel mit Paraldehyd niedergeschlagen wird und die wäßrige Lösung dieses Niederschlages mit Phenylhydrazinlösung einen rotbraunen, amorphen Niederschlag gibt. Das Verfahren wird, wie folgt, ausgeführt: 10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden in einem engen Gefäße mit senkrechten Wänden (z. B. einem weißen Arzneiglase) je nach der Stärke der Färbung mit 30—50 ccm Paraldehyd, hierauf mit soviel wasserfreiem Alkohol versetzt, daß die Flüssigkeiten sich mischen; gewöhnlich sind 15—20 ccm Alkohol dazu erforderlich. Bei Gegenwart von Caramel setzt sich innerhalb 24 Stunden am Boden des Gefäßes ein bräunlichgelber bis dunkelbrauner, fest anhaftender Niederschlag ab. Man gießt die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit ab, spült den Niederschlag zur Entfernung des Paraldehyds mit wenig wasserfreiem Alkohol ab, löst ihn in heißem Wasser, filtriert die Lösung und engt sie auf 1 ccm ein. Aus der Stärke der Färbung kann man ungefähr auf die Größe des Caramelzusatzes schließen. Alsdann gießt man die Caramelösung in eine frisch bereitete Phenylhydrazinlösung (erhalten durch Auflösen von 2 g salzsaurem Phenylhydrazin und 2 g Natriumacetat in 20 g Wasser). Schon in der Kälte entsteht ein Niederschlag, doch kann man durch ganz kurzes Erwärmen dessen Bildung befördern. Ist sehr wenig Caramel vorhanden, so entsteht anfangs nur eine Trübung, die sich erst nach 24 Stunden abgesetzt hat. Da die Phenylhydrazinlösung nach kurzem Stehen schon allein rotbraune harzige Ausscheidungen bildet, welche namentlich bei Anwesenheit kleiner Mengen Caramel die Caramelreaktion verdecken können, so schichtet man in diesem Falle eine etwa 2 cm hohe Schicht Äther über die Flüssigkeit; der Äther nimmt, namentlich wenn man das Glas mehrmals sanft umkehrt, die harzigen Stoffe vollständig auf und bildet eine mehr oder minder gefärbte Lösung. In der unter der Ätherschicht stehenden wäßrigen Flüssigkeit setzt sich der amorphe, schmutzig- oder rotbraune Caramel-Phenylhydrazinniederschlag ab.

Die bei Naturweinen durch Zusatz von Paraldehyd erhaltenen weißen Fällungen geben mit Phenylhydrazinlösung keinen Niederschlag.

**2. Verfahren von A. JÄGERSCHMID<sup>4</sup>.** 100 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit (Wein, Weinbrand, Bier) werden in einem hohen Becherglase mit Albuminlösung (gleiche Teile frisches Hühnereiweiß und Wasser) gehörig durchgemischt und auf direktem Feuer unter stetem Rotieren bis zur vollständigen Albuminabscheidung erhitzt. Das Filtrat wird auf dem Dampfbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und ein Teil davon mit Äther, der andere mit Aceton in einer Porzellanschale emulgiert. Die ätherische Lösung wird nach und nach in eine oder zwei Vertiefungen einer Porzellantüpfelplatte abgegossen. Nach dem Verdunsten des Äthers werden ein bis zwei Tropfen einer frisch bereiteten Resorcin-Salzsäurelösung (1 g Resorcin auf 100 ccm konz. Salzsäure) mittels

<sup>1</sup> Über die Caramelbildung siehe C. J. KRUISHEER: Z. 1933, 65, 289.

<sup>2</sup> Weine, die aus gekochtem bzw. eingedampftem Most hergestellt sind — und demgemäß auch aus solchen Weinen hergestellte Essige — enthalten vielfach auch etwas Caramel. Das gleiche ist nach H. MASTBAUM (Z. 1933, 66, 254) anscheinend auch der Fall bei Weinen, die in südlichen Ländern (Portugal) aus Trauben hergestellt sind, die während der Reifung längere Zeit Temperaturen von 50—60° ausgesetzt sind.

<sup>3</sup> C. AMTHOR: Zeitschr. analyt. Chem. 1885, 24, 30.

<sup>4</sup> A. JÄGERSCHMID: Z. 1909, 17, 113 u. 269.

einer Pipette zugeträufelt. Beim Vorhandensein von Caramel<sup>1</sup> tritt sofort eine kirschrote Färbung ein, die dauernd anhält. Der Acetonauszug (nötigenfalls filtriert) gibt, mit gleichen Teilen konz. Salzsäure in einem Reagensglase übergossen, bei Gegenwart von Caramel eine carmoisinrote Färbung.

**3. Verfahren von G. H. P. LICHTHARDT<sup>2</sup>.** Das Verfahren beruht auf der Fällbarkeit von Caramel durch Tannin in schwefelsaurer Lösung. Zur Herstellung des Reagens löst man 1 g Tannin in 30 ccm Wasser, gibt 0,75 g Schwefelsäure (1,84) hinzu und ergänzt mit Wasser auf 50 g. Nach 24stündigem Stehen wird die Lösung filtriert. 5 ccm der zu prüfenden, von einem etwaigen Alkoholgehalt befreiten Flüssigkeit werden mit 5 ccm des Reagens versetzt und gelinde erwärmt, bis der entstandene Niederschlag wieder gelöst ist. Ist Caramel zugegen, so bildet sich im Laufe von 12 Stunden ein brauner Niederschlag.

**4. Sonstige Verfahren.** a) Nach MARSH<sup>3</sup> schüttelt man das zu prüfende Präparat mit einer Emulsion von 3 ccm Phosphorsäure, 3 ccm Wasser und 100 ccm Amylalkohol. Bei Anwesenheit von Caramel färbt sich die wäßrige Schicht braun.

b) Nach D. SCHENK<sup>4</sup> schüttelt man den Farbstoff in mäßig verdünnter, wäßriger Lösung mit Äther aus, versetzt den Äther in einer Porzellanschale mit 10 Tropfen einer ätherischen Phenollösung (5 : 100) und fügt nach dem Verdunsten des Äthers 5 ccm konz. Schwefelsäure hinzu. Es tritt eine orangefelbe Färbung ein, falls Caramel zugegen ist.

c) Nach C. A. CRAMPTON und F. D. SIMONS<sup>5</sup> wird Caramel durch Walkererde sehr energisch absorbiert. Man schüttelt 50 ccm der auf Caramel zu prüfenden Lösung (Essig) mit 25 g Walkererde, läßt  $\frac{1}{2}$  Stunde stehen, filtriert und vergleicht die Stärke der Färbung vor und nach der Behandlung.

## D. Nachweis von künstlichen Farbstoffen.

Wenn durch die in Abschnitt A (S. 1178) angegebenen Verfahren die Gegenwart von künstlichen Farbstoffen nachgewiesen ist, so kann es erforderlich werden, die Art des betreffenden Farbstoffes nachzuweisen, was aber, wie schon oben (S. 1178) hervorgehoben wurde, meist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden ist. Ebenso wird es nicht immer möglich sein, in Substanz vorliegende künstliche Farbstoffe für Lebensmittel, insbesondere Gemische von mehreren Farbstoffen, zu identifizieren.

Um festzustellen, ob eine vorliegende Farbe einheitlich oder ein Gemisch von Farbstoffen ist, kann man in folgender Weise verfahren: Man bläst geringe Mengen des Farbpulvers über ein mit Wasser oder Alkohol angefeuchtetes Filtrierpapierblatt. Liegt ein Gemisch von Farbstoffen vor, so geben die einzelnen Partikel des Pulvers verschiedene gefärbte Flecken.

Sind verschiedene Farbstoffpulver nicht trocken gemischt, sondern Farbstofflösungen zusammen eingedampft und getrocknet, so führt das obige Verfahren nicht zum Ziele. In diesem Falle prüft man die Farbe durch Capillaranalyse (S. 70).

Im nachfolgenden sollen lediglich die wichtigsten für die Färbung der Lebensmittel in Frage kommenden Farbstoffe berücksichtigt werden; im übrigen muß auf Spezialwerke<sup>6</sup> verwiesen werden.

Über die physiologische Wirkung künstlicher Farbstoffe siehe Bd. I, S. 1040.

<sup>1</sup> Die Reaktion beruht auf der Bildung von Oxymethylfurfurol, das bei dem Erhitzen von fructosehaltigem Zucker (Saccharose) entsteht (SELIWANOFFSche Reaktion); aus Glucose hergestelltes Caramel gibt daher diese Reaktion nicht.

<sup>2</sup> G. H. P. LICHTHARDT: Journ. Ind. engin. Chem. 1910, 2, 389; C. 1910, II, 1781.

<sup>3</sup> MARSH: Mercks Reagenzien-Verz. 1929, 381.

<sup>4</sup> D. SCHENK: Apoth.-Ztg. 1914, 29, 202; Z. 1915, 29, 389.

<sup>5</sup> C. A. CRAMPTON u. F. D. SIMONS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1899, 21, 355; Z. 1899, 2, 954.

<sup>6</sup> G. SCHULTZ-LEHMANN: Farbstofftabellen, Bd. 1, 1930; Bd. 2, 1931. — P. RUGGLI: Praktikum der Färberei und Farbstoffanalyse. München: J. F. Bergmann München 1925. Vgl. ferner den Artikel „Organische Farbstoffe“ von H. E. FIERZ-DAVID u. A. MONSCH in LUNGE-BERLS Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, 8. Aufl., Bd. 5, S. 1215 bis 1443. Berlin: Julius Springer 1934.

### 1. Bei Lebensmitteln vorwiegend verwendete künstliche Farbstoffe.

a) In Deutschland bestehen bis jetzt keine besonderen Bestimmungen über die bei Lebensmitteln zum Färben zugelassenen künstlichen Farbstoffe.

Durch das Farbengesetz vom 5. Juli 1887 wird lediglich bestimmt, daß gesundheitsschädliche Farben zur Herstellung von Lebensmitteln nicht verwendet werden dürfen und daß neben dem natürlichen Farbstoff Gummigutti von den künstlichen organischen Farbstoffen Corallin und Pikrinsäure gesundheitsschädliche Farben im Sinne des Gesetzes sind.

b) In der Schweiz sind nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch folgende künstlichen organischen Farbstoffe zum Färben von Lebensmitteln zugelassen<sup>1</sup>:

Rote: Erythrosin, Phloxin P, Ponceau, Neucoccin, Amaranth, Bordeaux BL, Fuchsin, Säurefuchsin, Eosin wasserlöslich und spritlöslich, Roccellin.

Orange und gelbe: Orange L, Tropaeolin 000 Nr. 1, Chrysoidin R, Sudan I und G, Buttergelb O, Säuregelb R, Naphtholgelb S, Tartrazin, Auramin O.

Blaue und violette: Anilinblau spritlöslich, Wasserblau, Indulin, Indigocarmin, Alizarinblau, Methylviolett.

Grüne: Lichtgrün SF gelblich, Malachitgrün.

c) In Frankreich sind gestattet<sup>2</sup>:

Rote: Erythrosin, Eosin, Benzalrot, Bordeaux B u. S, Neucoccin, Echtrot, Ponceau RR, Ecariate R, Säurefuchsin.

Orange und gelbe: Orange I, Auramin, Chrysoin, Naphtholgelb.

Blaue und violette: Wasserblau, Patentblau, Pariserviolett (Methylviolett).

Grüne: Säuregrün I, Malachitgrün.

d) In den Vereinigten Staaten von Amerika sind nur zugelassen:

Rote: Amaranth, Ponceau 3 R, Erythrosin.

Orange und gelbe: Orange I, Naphtholgelb S, Tartrazin.

Blaue: Indigocarmin, Indigodisulfosäure.

Grüner: Lichtgrün SF gelblich.

e) In England werden als schädlich angesehen: Pikrinsäure, Victoriagelb, Martiusgelb, Aurantia und Aurin<sup>3</sup> und in Italien sind für Teigwaren verboten: Martiusgelb, Metanilgelb, Victoriagelb und Pikrinsäure<sup>4</sup>.

### 2. Verhalten von künstlichen Farbstoffen für Lebensmittel gegen Säuren und Alkalien.

O. N. WITT<sup>5</sup>, E. WEINGÄRTNER<sup>6</sup> und A. G. ROTA<sup>7</sup> haben schon vor längerer Zeit das Verhalten von Teerfarben gegen Wasser, Salzsäure, Schwefelsäure, Ammoniak, Reduktionsmittel (Zink- bzw. Zinnchlorür und Salzsäure) und Tanninreagens (25 g Tannin, 25 g Natriumacetat und 250 g Wasser) geprüft, um eine Einteilung in Farbstoffgruppen und die Kennzeichnung der einzelnen Farbstoffe zu ermöglichen.

In der Tabelle 3 auf S. 1192 sind derartige Reaktionen nach dem Werke von SCHULTZ-LEHMANN<sup>8</sup> und nach den Angaben von P. RUGGLI und H. BENZ<sup>9</sup> zusammengestellt; letztere machen weitere Angaben über Konstitution, Löslichkeit, Reaktionen, färberisches Verhalten der einzelnen Farbstoffe und ihre

<sup>1</sup> Schweizer. Verordnung, betr. den Verkehr mit Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen vom 23. Februar 1926 (bis 31. Dezember 1928); Gesetze und Verordnungen, betr. Lebensmittel 1929, 21, 105 (131). — P. RUGGLI u. H. BENZ: Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene 1934, 25, 345.

<sup>2</sup> L. RONNET: Ann. Falsif. 1911, 4, 474; C. 1911, II, 1490.

<sup>3</sup> A. R. JAMIESON u. C. M. KEYWORTH: Analyst 1928, 53, 418.

<sup>4</sup> A. PIUTTI u. G. BENTIVOGLIO: Gazz. chim. Ital. 1906, 36 II, 385; C. 1906, II, 1629.

<sup>5</sup> O. N. WITT: Chemische Ind. 9, 1; Zeitschr. analyt. Chem. 1887, 26, 101.

<sup>6</sup> E. WEINGÄRTNER: Chem.-Ztg. 1887, 11, 13; 1888, 12, 232.

<sup>7</sup> A. G. ROTA: Chem.-Ztg. 1898, 22, 437.

<sup>8</sup> SCHULTZ-LEHMANN: Farbstofftabellen, Bd. I, 1930.

<sup>9</sup> P. RUGGLI u. H. BENZ: Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene 1934, 25, 345.

Unterscheidung von anderen Farbstoffen, auf die hier verwiesen sei. K. E. DOBROWOLSKI<sup>1</sup> macht Angaben über die Empfindlichkeit der Reaktionen zum Nachweise von künstlichen Farbstoffen.

### 3. Nachweis einzelner künstlicher Farbstoffe.

a) **Analysengang nach L. RONNET**<sup>2</sup>. Er hat für die Identifizierung der in Frankreich zur Färbung von Lebensmitteln zugelassenen künstlichen Farbstoffe den in der Tabelle 4 auf S. 1196 wiedergegebenen Analysengang ausgearbeitet.

b) **Verfahren nach E. H. INGERSOLL**<sup>3</sup>. Zum Nachweis der in den Vereinigten Staaten von Nordamerika für Lebensmittel zugelassenen Farbstoffe: Amaranth, Ponceau 3 R, Erythrosin, Tartrazin, Orange I, Naphtholgelb S, Lichtgrün SF gelblich und Indigodisulfosäure wurde folgendes Verfahren vorgeschlagen:

0,1—0,2 g der Farbstoffprobe werden in einem Mörser mit 25 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung verrieben und durch ein trockenes Filter filtriert. Falls das Filtrat rot gefärbt ist, wäscht man den Rückstand im Mörser und auf dem Filter nach und nach mit je 10—15 ccm der Ammoniumsulfatlösung bis das Waschwasser nicht mehr rot gefärbt ist. Filtrat und Waschwasser enthalten den größeren Teil des Amaranths mit etwas Naphtholgelb S und einiges Tartrazin.

Zur Entfernung des Naphtholgelb S werden Filtrat und Waschwasser vereinigt und mehrmals mit Essigäther ausgeschüttelt, bis der Essigäther nicht mehr gelb gefärbt ist.

Amaranth und Tartrazin werden aus der Ammoniumsulfatlösung durch Ausschütteln mit Aceton gewonnen. Die Acetonlösung wird mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt, das Aceton auf dem Wasserbade verjagt, der Rückstand wird mit Natriumchlorid gesättigt, Alaunstein hinzugegeben, geschüttelt und erwärmt. Nach dem Absitzen filtriert man und wäscht mit warmer gesättigter Natriumchloridlösung aus bis zum Verschwinden der Gelbfärbung. Der Filtrerrückstand wird in gesättigter Ammoniumsulfatlösung aufgeschlemmt und durch Ausschütteln mit Aceton gewinnt man das Amaranth. Das Filtrat enthält Tartrazin.

Den in Ammoniumsulfatlösung unlöslichen Rückstand der Ausgangsprobe löst man in Wasser, säuert mit Essigsäure an, und schüttelt mehrmals mit Äther aus, bis der Äther nicht mehr gefärbt ist. Der Äther enthält Erythrosin. Die ätherische Lösung wird mehrmals mit Wasser gewaschen und durch Ausschütteln mit verd. Ammoniaklösung wird das Erythrosin isoliert. Man verdampft die Ammoniaklösung auf dem Wasserbade und verdünnt stark. Eine etwaige Fluoreszenz zeigt die Anwesenheit verbotener Farbstoffe ähnlicher Reaktion an.

Man dampft nun weiter den Äther aus der essigsäuren Lösung ab, sättigt auf dem Wasserbade mit Natriumchlorid im Überschuß, kühlt ab und filtriert durch ein trockenes Filter, wäscht mit gesättigter Natriumchloridlösung aus, bis der Niederschlag farblos ist. Ist der Niederschlag von schleimiger, schwer auswaschbarer Beschaffenheit, so löst man ihn vom Filter ab, salzt wieder aus, wiederholt unter Umständen nochmals und vereinigt die Filtrate, die Lichtgrün SF gelblich, Naphtholgelb S, Tartrazin, Spuren von Orange I und möglicherweise auch noch Amaranth enthalten.

Zur Entfernung des Naphtholgelb S schüttelt man mehrfach mit Aceton aus, bis die Ausschüttelung farblos ist. Die vereinigten Auszüge salzt man zur Entfernung von Spuren Tartrazin, Lichtgrün SF gelblich mit gesättigter Natriumchloridlösung aus. Die zurückbleibende Acetonlösung verdünnt man mit dem gleichen Volumen Wasser und verdampft das Aceton auf dem Wasserbade, säuert den wäßrigen Rückstand an und entfernt Spuren von Orange I mit Amylalkohol. Nach dem Vertreiben der in der wäßrigen Lösung verbliebenen Reste des Amylalkohols prüft man auf Naphtholgelb S.

Zur Trennung des Lichtgrüns SF gelblich vom Tartrazin in der von Naphtholgelb S freien Lösung verdampft man das Aceton aus der wäßrigen Salzlösung, gibt auf je 10 ccm der wäßrigen Farbstofflösung 0,5 g Fullererde zu, erwärmt, läßt absetzen, filtriert, wäscht

<sup>1</sup> K. E. DOBROWOLSKI: Dissertation Odessa 1904; Z. 1906, 12, 634.

<sup>2</sup> L. RONNET: Ann. Falsif. 1911, 4, 474; C. 1911, II, 1490.

<sup>3</sup> E. H. INGERSOLL: Journ. Ind. a. Engin. chem. 1917, 9, 955; C. 1918, I, 1078. Das Verfahren ist eine Abänderung der Verfahren von T. M. PRICE, Circular 180 des U. S. Department of Agriculture Washington Bureau of animal. Industry 1911, 5/6 und von ESTES: Journ. Ind. a. Engin. chem. 1916, 8, 1123.



Tabelle 3. Verhalten von künstlichen Farben für Lebensmittel gegen Säuren und Alkalien<sup>1</sup>.

| Nr.                 | Handelsbezeichnung  | Wissenschaftliche Bezeichnung   | Farbe des Pulvers  | Farbe in Wasser (A = in Alkohol)     | Verhalten gegen          |                                    | Nr. nach SCHULTZ-LEHMANN                |     |
|---------------------|---|---|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|---|-----|
|                     |   |   |                    |                                      | konz. Salzsäure          | konz. Schwefelsäure<br>Natronlauge |   |     |
| a) Rote Farbstoffe. |   |   |                    |                                      |                          |                                    |   |     |
| 1                   | Erythrosin B oder Erythrosin I extra, Pyrosin B [Mo], Jodeosin B  | Alkalisalz des Tetrahydrofluoresceins   | rotbraun           | kirschrot ohne Fluoreszenz           | braungelber Niederschlag | braungelb; mit W. braungelber N.   | löslicher roter Niederschlag            | 887 |
| 2                   | Phloxin P oder Erythrosin BB  | (desgl. des Tetrahydrofluoresceins  | braun              | kirschrot, grünlichgelbe Fluoreszenz | bräunlichgelber N.       | braungelb                          | blaurot                                 | 888 |
| 3                   | Ponceau 2 R, oder P. Cc oder GR oder P. R. oder Xylidinscharlach oder Xylidin-Ponceau                   | Natriumsalz der Xylidin-azo-2-naphthol-3-6-disulfosäure                                       | rot                | rot                                  | unverändert              | kirschrot; mit W. rotgelb          | dunkler und gelber                      | —   |
| 4                   | Neuceocin, Cochemillerot A, Croceinscharlach 4 BX, Ponceau 4 R  | 1,4 Naphthylaminsulfosäure-azo-2,6,8-naphtholdisulfosäure                                     | scharlachrot       | scharlachrot                         | unverändert              | schmutzig-rotviolett               | braun                                   | 213 |
| 5                   | Amaranth oder Echrotrot E [B] oder Echrotrot NS' oder Naphtholrot S [B] oder Pourgon [LP] oder Bordeaux | Natriumsalz der Naphthionsäure-azo-2-naphthol-3-6-sulfosäure                                  | rotbraun           | fuchsinrot                           | unverändert              | violett; mit W. blauviolett        | dunkler                                 | 212 |
| 6                   | Bordeaux BL oder B, G, R extra, Echrotrot B   | Natriumsalz der $\alpha$ -Naphthylamin-azo-2-naphthol-3-6-disulfosäure                        | —                  | fuchsinrot; A. blaurot               | unverändert              | blau; mit W. fuchsinrot            | gelbbraun                               | 123 |
| 7                   | Fuchsin oder Brillantfuchsin, Rubin oder Magenta  | Gemisch von salzsaurem und essigsaurem Parosanilin und dem entsprechenden Salz des Rosanilins | grüner Metallglanz | rot; A. rot; in Äther unlöslich      | gelb                     | hellbraun; mit W. fast farblos     | fast farblos unter Abscheidung der Base | 780 |
| 8                   | Säurefuchsin, Fuchsin S, Rubin S, Acid Magenta  | Saures Natrium- oder Calciumsalz der Rosanilindisulfosäure                                    | grüner Metallglanz | blaurot; in A. fast unlöslich        | unverändert              | gelb                               | entfärbt zu schwachem Gelb              | 800 |

<sup>1</sup> Es bedeutet: A. = Alkohol, W. = Wasser, N. = Niederschlag.

|    |  |  |               |   |                          |                                       |                                    |     |
|----|--|--|---------------|---|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----|
| 9  | Eosin wasserlöslich, Eosin A, Eosin C extra, Eosin gelblich, Eosin T.J.F           | Alkalisalze des Tetrabromfluoresceins                                    | rötlich braun | blaurot, auch in A.; grüne bzw. gelbgrüne Fluorescenz   | gelbrote Flocken         | gelb; mit W. gelbroter Niederschlag   | dunkler und gelbroter Niederschlag | 881 |
| 10 | Eosin spritlöslich, Eosin SBB, Spriteosin, Spritrosa                               | Kaliumsalz des Tetrabromfluorescein-äthylesters                          | braun         | kirschrot mit schwacher grünlich-gelber Fluorescenz; in A. rot mit bräunlich gelber Fluorescenz | gelbbräuner Niederschlag | gelb; mit W. braungelber Niederschlag | braungelber Niederschlag           | 883 |
| 11 | Roccellin, Echtröt, Echtröt A und O, Brillantrot, Rubidin, Cerasin, Orcellin Nr. 4 | Natriumsalz des $\alpha$ -Naphthylaminsulfosäure-azo- $\beta$ -naphthols | braunrot      | rot; in A. rot  | gelbbräuner Niederschlag | violett                               | unreiner und dunkler               | 206 |

## b) Orange und gelbe Farbstoffe.

|    |   |  |             |                                  |  |                                     |   |     |
|----|---|--|-------------|----------------------------------|--|-------------------------------------|---|-----|
| 12 | Orange I oder N, Brillantorange, Xylidinorange, Scharlach R, Xylidinscharlach | Natriumsalz der Xylidinazo-2-naphthol-6-sulfosäure     | zinnoberrot | rotgelb; in A. rotorange         | braunroter Niederschlag                | kirschrot; mit W. braunroter N.     | unverändert                                   | 98  |
| 13 | Tropäolin 000 Nr. 1, Orange I, Orange R extra, $\alpha$ -Naphtholorange       | Natriumsalz des Sulfaminsäure-azo- $\alpha$ -naphthols | rotbraun    | orange gelb; in A. orange        | brauner Niederschlag                   | violett; mit W. rotbraun            | kirschrot                                     | 185 |
| 14 | Chrysoidin  | Salzsaures Methylidiamidoazobenzol                     | rotbraun    | orange gelb                      | braungelbe Flocken; gallertige Fällung | braungelb; mit W. kirschrot         | rotbrauner N., in A. und Äther leicht löslich | 29  |
| 15 | Sudan I, Orange G, Orange fettlöslich, dunkelgelb                             | Anilin-azo- $\beta$ -naphthol                          | ziegelrot   | nicht löslich; in A. orange-gelb | rot                                    | fuchsinrot; mit W. orange-gelber N. | keine Lösung                                  | 33  |
| 16 | Buttergelb O, Fettgelb extra  | Anilin-azo-dimethylanilin                              | gelbbraun   | unlöslich; in A. gelb            | rot                                    | gelb; mit W. rot                    | orange-gelber N.                              | 28  |

| Nr.                               | Handelsbezeichnung   | Wissenschaftliche Bezeichnung   | Farbe des Pulvers     | Farbe in Wasser (A. = in Alkohol)    | Verhalten gegen  |  |                             | Nr. nach SCHULTZ-LEHMANN |
|-----------------------------------|--|---|-----------------------|--------------------------------------|--|--|-----------------------------|--------------------------|
|                                   |  |   |                       |                                      | konz. Salzsäure  | konz. Schwefelsäure                        | Natronlauge                 |                          |
| 17                                | <b>Säuregelb R</b> , Echthgelb R, G, S, Neugelb L, Solidgelb                       | Natriumsalz der Amidoazobenzolsulfosäure  | braungelb             | gelb                                 | fleischroter gallertiger N. und violette rötliche Nadeln | braungelb; mit W. orange gelb              | unverändert                 | 172                      |
| 18                                | <b>Naphtholgelb S</b> oder Schwefelgelb S, Säuregelb S, Anilingelb, Citronin       | Alkalisalze der 2-4-Dinitro-1-naphthol-7-sulfosäure   | orange gelb           | gelb                                 | heller werdend   | grünlichgelb                               | unverändert                 | 19                       |
| 19                                | <b>Tartrazin</b> , Tartrazin O, Hydrazingelb O                                     | Trinatriumsalz des Farbstoffs aus Sulfanilsäure und 1-p-Sulfophenyl-pyrazolon-3-carbonsäure | orange gelb           | goldgelb                             | unverändert  | orange gelb; mit W. gelb                   | rotore Färbung              | 737                      |
| 20                                | <b>Sudan I</b> , gelb G R fettlöslich  | Anilin-azo-resorcin   | braun bis orange gelb | fast unlöslich; in A. und Äther gelb | unverändert  | braungelb                                  | orange gelb                 | 31                       |
| 21                                | <b>Auramin O</b> , Fettgelb A, Pyocetaneum aureum                                  | Salzsaures Tetramethyldiamido-benzophenonimid   | schwefelgelb          | hellgelb; in A. gelb                 | dunkelgelb   | farblos; mit W. hellgelb                   | weißer N. von Auraminbase   | 752                      |
| c) Blaue und violette Farbstoffe. |  |   |                       |                                      |  |  |                             |                          |
| 22                                | <b>Anilinblau</b> , Spritblau SFC, Gentianablau 6 B, Opalblau, Lichtblau           | Salz-, schwefel- oder essigsaures Triphenylrosanilin oder Triphenyl-p-rosanilin             | dunkelbraun           | unlöslich; in A. blau                | unverändert  | braungelb; mit W. blauer N.                | Lösung in A. braunrot       | 791/792                  |
| 23                                | <b>Wasserblau</b> , Chinablau, Reinblau  | Trisulfophenyl-p, p'-diaminofuchsin-ammonium  | schwarzviolett        | blau; in A. fast unlöslich           | unverändert, teilweise N. von Disulfosäure               | rotgelb; mit W. blau und blauer N.         | braunrot                    | 816                      |
| 24                                | <b>Indulin</b> , Echthblau B, 6, R, 3 R Solidblau B und BE, Nigrosin wasserlöslich | Natriumsalze der Sulfosäuren der verschiedenen spritlöslichen Induline                      | schwarzbraun          | blauviolett; in A. blau              | blau und blauer Niederschlag                             | blau; mit W. violette Lösung und blauer N. | braunvioletter Niederschlag | 984                      |

|                      |  |   |                        |   |                               |  |   |      |
|----------------------|--|---|------------------------|---|-------------------------------|--|---|------|
| 25                   | <b>Indigoearmin, Indigotine</b><br>I a, Indigoextrakt                                  | Natriumsalz der Indigodisulfosäure                                      | blau                   | blau; in A. wenig löslich                           | blauviolett                   | blau; mit W. blau                                    | grün bis gelbgrün                         | 1309 |
| 26                   | <b>Alizarinblau.</b> Alizarinblau<br>A, F, R; AB, GW, RR, DNW                          | Dioxy-antrachinon-chinolin  | dunkelblau             | unlöslich; in A. wenig löslich und beim Kochen blau | gelbrot                       | carmoisinrot; mit W. gelbrot                         | blau; mit mehr NaOH grün                  | 1178 |
| 27                   | <b>Methylviolett, Methylviolett</b><br>B, 2 B und V 3, Pariser-violett                 | Salzsaures Penta- und Hexa-p-rosamin                                    | mit grünem Metallglanz | violett; in A. violett                              | blau, dann grün und gelbbraun | gelb; mit W. gelbgrün, dann grün-blau und violett    | braunrot und Niederschlag                 | 783  |
| d) Grüne Farbstoffe. |  |   |                        |   |                               |  |   |      |
| 28                   | <b>Lichtgrün SF, gelblich, Säuregrün D, Säuregrün extra konz., O gelblich, G extra</b> | Natriumsalz der Dimethyl-dibenzyl-diamidodiphenyl-carbinoltrisulfosäure | mit grünem Metallglanz | grün; in A. grün                                    | gelbbraun                     | gelb; mit W. allmählich grün                         | entfärbt und schmutzig violett            | 765  |
| 29                   | <b>Malachitgrün, Neu-, Victoria-, Diamant- und Solidgrün</b>                           | Salzsaures Tetramethyl-dip-amidophenyl-carbinol                         | grün                   | blaugrün; in A. blaugrün                            | rotgelb                       | gelb; mit W. erst dunkelgelb, dann gelbgrün und grün | grünlich weißer Niederschlag der Farbbase | 754  |

mit Wasser, löst das Lichtgrün SF gelblich mit heißem Eisessig vom Filter und identifiziert es. Lag Tartrazin in der Ausgangsprobe vor, so ist das vom Lichtgrün SF gelblich-Niederschlag ablaufende Filtrat goldgelb gefärbt; diese Färbung wird durch Salzsäure nicht zerstört. Hier kommt auch vorher etwa unvollständig entferntes Naphtholgelb S in gelblicher Färbung, die aber durch Salzsäure zum Verschwinden gebracht werden kann, zum Vorschein.

Das in dieser Gruppe noch vorhandene Tartrazin trennt man von etwa mit vorhandenen Spuren von Amaranth durch Zugabe von je 10 g Alaun auf 100 ccm Lösung, Erwärmen und Filtrieren der Lösung. Das Tartrazin geht in das Filtrat, woraus es isoliert und nach Abdampfen des isolierenden Lösungsmittels in Alkohol aufgelöst wird.

Den beim Aussalzen mit überschüssigem Natriumchlorid erhaltenen und mit Natriumchloridlösung ausgewaschenen, auf dem Filter verbliebenen Orange I, Ponceau 3 R und Indigodisulfosäure neben Natriumchlorid enthaltenden Niederschlag löst man in Wasser und extrahiert daraus mit 3 Portionen Essigäther das Orange I. Den vereinigten Essigätherextrakt wäscht man mit gesättigter Natriumchloridlösung bis zur Farblosigkeit und gewinnt hieraus das Orange I durch Ausschütteln mit Wasser und Verdampfen dieser wäßrigen Lösung.

Die noch Ponceau 3 R und Indigodisulfosäure enthaltende Restflüssigkeit befreit man auf dem Wasserbade vom Essigäther, gibt nach dem Erkalten 10 g granuliertes Calciumchlorid zu, läßt 15 Minuten stehen, versetzt mit 15 ccm frisch bereiteter Zinnchlorürlösung (3% Sn und 12% HCl, 1,19), läßt unter Umrühren bis zum Verschwinden der blauen Farbe stehen, filtriert das ausgeschiedene Ponceau 3 R sogleich, wäscht zweimal mit 25% iger Calciumchloridlösung aus, löst vom Filter mit verd. Ammoniak und prüft hierin auf Ponceau 3 R.

Zu dem Filtrat von Ponceau 3 R, das praktisch farblos sein soll, fügt man Wasserstoffsulfoxyd-lösung (3%) hinzu. Eine tiefblaue Färbung zeigt Indigodisulfosäure an.

Tabelle 4. Analysengang zum Nachweis künstlicher Farbstoffe nach L. RONNET.

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| <p>Die wäßrige Lösung des Farbstoffes wird durch Zusatz von Kalilauge (10%) alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt.</p> <p>Der Äther ist gefärbt oder ungefärbt, färbt sich jedoch durch Schütteln mit Essigsäure (5%)</p>  |  | <p>Die wäßrige Lösung des Farbstoffes wird durch Schütteln mit Essigsäure (5%)</p> <p>Der Äther ist ungefärbt, färbt sich auch nicht durch Schütteln mit Essigsäure (5%)</p>   |  |
| <p>Basische Farbstoffe</p> <p>Amino-derivate des Diphenylmethans</p> <p>Gelber Farbstoff <i>Auramin</i></p> <p>Grüner Farbstoff <i>Malachitgrün</i></p> <p>Violetter Farbstoff <i>Pariserviolett</i></p> <p>Nicht reduzierbar durch Zinnchlorür in salzsaurer Lösung</p>                                      |  | <p>Saure Farbstoffe</p> <p>Der Äther ist gefärbt oder entfärbt sich durch Schütteln mit Ammoniak (20%):</p> <p>Oxyazoverbindungen</p> <p>rot orange gelb</p> <p><i>Bordeaux B</i> <i>Chrysoin</i></p> <p><i>Krysal-Ponceau</i></p> <p><i>Bordeaux S Orange I</i></p> <p><i>Neuococcin</i></p> <p><i>Echtrot</i></p> <p><i>Ponceau RR</i></p> <p><i>Ecavate R</i></p> <p>Reduzierbar durch Zinnchlorür in salzsaurer Lösung</p> |  |
| <p>Saure Farbstoffe</p> <p>Der Äther ist farblos und gibt nichts an Ammoniak (20%) ab.</p> <p>Saure Sulfofarbstoffe</p> <p>Nitrophenolverbindungen</p> <p>Hellgelb</p> <p>rot grün blau violett</p> <p><i>Säurefuchsin</i></p> <p><i>Säuregrün I</i></p> <p><i>Wasserblau 6 B</i></p> <p><i>Fatenblau</i></p> |  | <p>Saure Farbstoffe</p> <p>Der Äther ist farblos und gibt nichts an Ammoniak (20%) ab.</p> <p>Saure Sulfofarbstoffe</p> <p>Nitrophenolverbindungen</p> <p>Hellgelb</p> <p>rot grün blau violett</p> <p><i>Säurefuchsin</i></p> <p><i>Säuregrün I</i></p> <p><i>Wasserblau 6 B</i></p> <p><i>Fatenblau</i></p>  |  |

c) Nachweis von Pikrinsäure, Martius-, Metanil- und Victoriagelb. Zum Nachweis dieser und anderer schädlichen bzw. zum Färben von Lebensmitteln unzulässigen künstlichen Farbstoffe sind folgende Verfahren vorgeschlagen:

α) Verhalten gegen Säuren, Alkalien usw.

Tabelle 5.

| Handelsbezeichnung   | Wissenschaftliche Bezeichnung                              | Löslichkeit in Wasser (W.) und Alkohol (A.) | Verhalten gegen                                   |                                |   |
|--|--|---|---|--------------------------------|---|
|  |  |   | Salzsäure (konz.)                                 | Schwefelsäure (konz.)          | Natronlauge                               |
| <b>Pikrinsäure</b>   | Trinitrophenol (symmetrisches)                             | in kaltem W. schwer, in A. leicht löslich   | unverändert                                       | hellgelb; mit W. gelb          | tieforange                                |
| <b>Martiusgelb, Naphthylamin-gelb, Manchester-gelb, Naphtholgelb</b> | Natrium- oder Calciumsalz des 2.4-Dinitro-1-naphthols      | in W. u. A. gelb löslich                    | gelbe Abscheidung von Dinitro- $\alpha$ -naphthol | gelb; mit W. hellgelbe Fällung | rötlicher Niederschlag                    |
| <b>Metanilgelb Orange MN, Tropäolin G, Victoriagelb</b>              | Natriumsalz des m-Amidobenzolsulfonsäure-azo-diphenylamins | desgl. orangegelb                           | fuchsinrot und dunkler Niederschlag               | violett; mit W. fuchsinrot     | unverändert mit viel NaOH gelbe Blättchen |
| <b>Victoriagelb, Safransurrogat</b>                                  | Kaliumsalz von Dinitro-p-kresol und Dinitro-o-kresol       | desgl. stark gelb                           | weißer Niederschlag                               | schwachgelb; mit W. farblos    | unverändert                               |
| <b>Aurantia, Kaisergelb</b>  | Ammonium- oder Natriumsalz des Hexanitro-diphenylamins     | in W. orangegelb                            | gelber Niederschlag der Nitrosäure                | hellgelb; mit W. gelb          | tief orangegelb                           |

Nachweis von Pikrinsäure nach L. GRÜNHUT<sup>1</sup>. Die Lösung wird zunächst mittels weißer Seidenfäden in neutraler oder schwach schwefelsaurer Lösung 2 Stunden lang ausgefärbt. Tritt hierbei keine Gelbfärbung ein, wohl aber, wenn eine Spur Pikrinsäure zugesetzt wird, so ist in dem Gegenstand keine Pikrinsäure vorhanden gewesen. Tritt dagegen bei dem ursprünglichen Versuch Gelbfärbung auf, so wird die mit Schwefelsäure angesäuerte wäßrige Lösung mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und in letztere Lösung ein Seidenfaden gebracht; wird dieser gelb gefärbt, so ist die Anwesenheit von Pikrinsäure anzunehmen.

Behufs sicheren Nachweises kocht man einen Teil der wäßrigen Lösung mit Kaliumcyanid und Kalilauge, wodurch infolge Bildung von Isopurpursäurem Kalium Rotfärbung auftritt. Durch Kochen mit 0,25 N.-Natronlauge und Glucose läßt sich die Pikrinsäure in Pikraminsäure (rote Nadeln) umwandeln.

Bei der Reduktion mit Zink und Salzsäure gibt Pikrinsäure eine blaue und Victoriagelb eine blutrote Lösung. Mit Zinnchlorür und Salzsäure wird Metanilgelb zuerst braun und dann purpurn.

β) Verfahren von A. PIUTTI und G. BENTIVOGLIO<sup>2</sup>. Man schlägt den Farbstoff in bekannter Weise durch Kochen der schwach salzsauren Lösung auf entfetteter Wolle nieder, wäscht diese wiederholt mit Wasser und kocht von

<sup>1</sup> L. GRÜNHUT: Zeitschr. öffentl. Chem. 1898, 4, 563.

<sup>2</sup> A. PIUTTI u. G. BENTIVOGLIO: Gazz. chim. Ital. 1906, 36, II, 385; C. 1906, II, 1629.

neuem mit ammoniakalischem Wasser, säuert mit Salzsäure an, um die Farbe auf einem neuen Wollfaden niederzuschlagen. Darauf extrahiert man den Farbstoff wieder mit sehr verd. Ammoniak. Der gelbe Verdampfungsrückstand des Extraktes liefert mit Wasser eine klare Lösung der betreffenden Farbstoffe. Beim Trocknen des Rückstandes muß die Bildung unslösllicher Häutchen möglichst vermieden werden; wenn sie aufgetreten sind, so müssen sie abfiltriert und auf Metanilgelb mit verd. Salzsäure und auf Pikrinsäure mit Ammoniumsulfid geprüft werden. Sodann prüft man 1 ccm der erhaltenen, gelben wäßrigen Lösung auf die Gegenwart von Farbstoffen mit  $\text{NO}_2$ -Gruppen, indem man mit Zinnchlorür unvollständig unter Zusatz von etwas Kalilauge oder besser Natrium- oder Kaliumalkoholat reduziert. Tritt keine Rötung (Gegenwart von  $\text{NO}_2$ -Gruppen enthaltenden Farbstoffen) mit Natriumalkoholat oder Violettfärbung (Gegenwart von Metanilgelb) mit einer verd. Säure ein, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich. Andernfalls säuert man die ganze Flüssigkeit mit Essigsäure an und schüttelt kräftig mit Tetrachlorkohlenstoff durch:

Tabelle 6.

| $\text{CCl}_4$ löst ohne Färbung                                 |  | In der essigsäuren Lösung verbleiben   |   |   |
|--|--|--|---|---|
| Martiusgelb  | Victoriagelb   | Metanilgelb  | Pikrinsäure   | Naphtholgelb S  |
| Gehen wieder mit wäßrigem $\text{NH}_3$ in Lösung. Ein Teil gibt |  | Man verdampft auf dem Wasserbade, nimmt mit Wasser auf und teilt in 3 Teile. |   |   |
| a) Mit $\text{SnCl}_2 + \text{NH}_3$<br>rosa Niederschlag        | b) Mit $\text{Zn} + \text{HCl}$<br>rosa gefärbte Flüssigkeit | I.<br>Gibt mit $\text{HCl}$ violette Färbung                                 | II.<br>Gibt mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ rotbraune Färbung | III.<br>Reduziert mit $\text{Zn} + \text{NH}_3$ , dann mit $\text{Zn} + \text{HCl}$ ; gibt a) mit $\text{KOH}$ Gelbfärbung und b) mit $\text{FeCl}_3$ Orangefärbung |
| ↓  | ↓  | ↓  | ↓   | ↓   |
| Martiusgelb  | Victoriagelb   | Metanilgelb<br>(Tropäolin G)   | Pikrinsäure   | Naphtholgelb S  |

Mittels dieses Verfahrens lassen sich in 1 ccm Lösung noch nachweisen von Pikrinsäure und Martiusgelb 0,05, von Victoriagelb 0,03, von Naphtholgelb S 0,025 und von Metanilgelb 0,001 mg.

V. VETÈRE<sup>1</sup> hält die Anwendung von Tetrachlorkohlenstoff zum Nachweis der Farbstoffe nach A. PUVI und G. BENVIGNO für nicht ganz zuverlässig, da z. B. die für Martiusgelb angegebene Färbung mit allen Nitroderivaten und folglich auch mit Victoriagelb erhalten wird.

γ) Verfahren von A. R. JAMIESON und C. M. KEYWORTH<sup>2</sup>. Die Farbstoffe Pikrinsäure, Victoriagelb, Martiusgelb, Aurantia und Aurin geben mit verschiedenen Reagenzien wenig lösliche krystallinische Niederschläge, die sich mikroskopisch so deutlich unterscheiden lassen, daß sie einen verlässlichen Nachweis der einzelnen Farbstoffe gestatten.

Man stellt einen Auszug des Farbstoffes nach den üblichen Methoden her, konzentriert ihn auf etwa 1,5 ccm und verteilt auf 5 kleine Reagenzröhrchen ( $5 \times 60$  mm).

Den Inhalt des ersten Röhrchens prüft man auf die Anwesenheit von Sulfogruppen, da nur bei deren Abwesenheit die nachfolgenden Reaktionen für die in Frage kommenden Farbstoffe spezifisch sind. Man erwärmt mit Zinnchlorürlösung (3%) und Salzsäure (3%), bis die Farblösung teilweise reduziert ist, neutralisiert mit Natronlauge, falls der Farbstoff eine braunrote Färbung angenommen hat<sup>3</sup>. Darauf schüttelt man mit Äther aus; geht der Farbstoff nicht in die Ätherschicht über, so säuert man mit N.-Essigsäure an und

<sup>1</sup> V. VETÈRE: Giorn. Farmac. Chim. 56, 97; C. 1907, I, 1359.

<sup>2</sup> A. R. JAMIESON u. C. M. KEYWORTH: Analyst 1928, 53, 418.

<sup>3</sup> Vgl. A. G. ROTA: Chem.-Ztg. 1898, 22, 437.

schüttelt nochmals. Bei Gegenwart von Nitrofarbstoffen geht der Farbstoff in die Ätherschicht über, bei Gegenwart von Nitrofarbstoffen mit Sulfogruppen jedoch nur bei Anwesenheit von Säure oder Alkali.

Zum zweiten Röhrchen gibt man 1 Tropfen Berberinsulfatlösung (0,25%); ein Niederschlag zeigt die Anwesenheit von Pikrinsäure oder Martiusgelb an. Pikrinsäure gibt charakteristische gelbe Rosetten, Martiusgelb breite gelbe Nadeln, die gelegentlich auch in Büscheln auftreten. Pikrinsäure kann auch noch näher identifiziert werden durch Kaliumcyanid und Martiusgelb durch Goldchloridlösung (2%), bei dem sich deutliche feinkristalline gelbe Nadeln bilden. — Entsteht auf Zusatz von Berberinsulfatlösung weder ein Niederschlag noch eine Farbänderung, so kann der Inhalt weiter auf Victoriagelb geprüft werden: Zu 5 Tropfen der Lösung setzt man 2 Tropfen konz. Salzsäure und 1 Tropfen Wjssches Reagens, kocht einige Sekunden und fügt sofort ein Körnchen granuliertes Zink hinzu: Nach 12–48stündigem Stehen entsteht eine schwache blaßrote Färbung.

Zu dem dritten Röhrchen fügt man 1 Tropfen Phosphorwolframsäurelösung (10%); ein Niederschlag mit Entfärbung zeigt Aurantia an, welches noch näher durch Silicowolframsäurelösung (10%) identifiziert werden kann. Der Phosphorwolframsäureniederschlag bildet schöne sternförmige, stark polarisierende Krystalle. Silicowolframsäurelösung gibt charakteristische Krystalle, nämlich zigarrenförmige Nadeln mit kleinen Knoten in der Mitte.

Den Inhalt des vierten Röhrchens prüft man auf die Anwesenheit von Aurin. Nach Zusatz von 2 Tropfen Chromalaunlösung (5%) bildet sich ein roter Lack, der mit ein wenig Äther ausgezogen wird. Mit einer kleinen Pipette bringt man etwas von der gelbgefärbten Ätherlösung auf einen Objektträger, bei Gegenwart von Aurin bildet sich nach dem Verdunsten ein Ring von blaßrosa Farbe.

Den Inhalt des fünften Röhrchens gebraucht man zweckmäßig zur Bestätigung der vorstehenden Reaktionen.

Die weiteren Reaktionen sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 7. Reaktionen der Farbstoffe Pikrinsäure, Victoriagelb, Martiusgelb Aurantia und Aurin<sup>1</sup>.

Man verwendet 5 Tropfen (= 0,2 ccm) der Farbstofflösungen 1:10000 und läßt die Reaktionsflüssigkeiten über Nacht stehen.

| Reagenslösung              | Pikrinsäure           | Victoriagelb | Martiusgelb   | Aurantia                 | Aurin <sup>2</sup> |
|----------------------------|-----------------------|--------------|---------------|--------------------------|--------------------|
| Berberinsulfat (0,25%)     | Kryst.<br>×           | 0            | Kryst.<br>×   | schwacher N.             | 0                  |
| Phosphorwolframsäure (10%) | 0                     | entf.        | } entf. u. N. | entf. u. N.              | } gelb;<br>kein N. |
| Silicowolframsäure (10%)   | entf.;<br>geringer N. | entf. u. N.  |               | entf. u. Kryst.<br>×     |                    |
| Chromalaun (5%)            | 0                     | entf.        |               | entf. u. N.              |                    |
| Zink und Salzsäure (3%)    | entf.                 | blaßrot<br>× | entf.         | entf. u.<br>schwacher N. | entf.              |
| Goldchlorid (2%)           | 0                     | entf.        | Kryst.<br>×   | entf. u. N.              | entf.,<br>roter N. |

JAMIESON und KEYWORT geben Abbildungen der spezifischen Reaktionen der Krystallformen mit Pikrinsäure, Martiusgelb und Aurantia und ferner noch weitere Reaktionen mit Natriumbisulfid, Natriumpersulfat, Oxalsäure usw. an, auf die hier nur verwiesen werden kann.

δ) Nachweis von Corallin. Das technische Corallin<sup>3</sup> ist ein Gemisch von Rosolsäure-Derivaten; sein eigentlicher Farbbestandteil ist das Aurin, dessen Verwendung

<sup>1</sup> Es bedeutet: N. = amorpher Niederschlag; Kryst. = krystallinischer Niederschlag; entf. = entfärbt; × = spezifische Reaktion; 0 = keine Reaktion.

<sup>2</sup> Aurin ist ein Bestandteil des technischen Corallins; siehe δ).

<sup>3</sup> Das reine Corallin ist nicht gesundheitsschädlich; daß das Corallin im deutschen Farbensgesetz vom 5. Juli 1887 als solches bezeichnet worden ist, rührt daher, daß das technische Corallin früher häufig als Verunreinigungen Phenol und Arsen enthielt, die aber jetzt darin kaum mehr gefunden werden dürften.



nach dem deutschen Farbensgesetz nicht verboten ist. Es muß daher neben dem Aurin die in dem rohen Corallin zu 70% vorhandenen Pseudorosolsäure nachgewiesen werden.

Das technische Corallin unterscheidet sich nach L. GRÜNHUT<sup>1</sup> von Aurin und Rosolsäure dadurch, daß seine kirschrote bzw. purpurrote Auflösung in Natronlauge durch Zusatz von Ferricyankalium noch dunkler und stärker gefärbt wird, was von seinem Gehalt an Pseudorosolsäure herrührt. Bleibt diese Reaktion aus, so liegt kein Corallin vor. Zur Prüfung verreibt man das Lebensmittel mit Quarzsand oder verdampft Flüssigkeiten hiermit, kocht nacheinander mit Äther und Alkohol aus, verdunstet letztere, zieht den Rückstand mit verd. Natronlauge aus und versetzt die Lösung mit Ferricyankalium. Um ganz sicher zu gehen, soll man die Pseudorosolsäure nach ZULKOWSKI<sup>2</sup> abzuscheiden suchen. Im Filtrat der Pseudorosolsäure muß Aurin nachzuweisen sein.

#### d) Nachweisbarkeit von künstlichen Farbstoffen in faulenden Lebensmitteln.

A. CUTOLO<sup>3</sup> hat zu ermitteln gesucht, wie lange Zeit Teerfarbstoffe in faulenden Lebensmitteln sich halten und nachgewiesen werden können.

Die verwendeten Lebensmittel (Rot- und Weißwein, Sirup, Tomaten- und Fruchtdauerwaren, Liköre, Teigwaren, Stärke- und Eiweißlösung, Stärke mit Wasser und Salzfleisch) wurden unter Bedingungen aufbewahrt, welche die Zersetzung und das Verderben unterstützten.

Als Farbstoffe dienten zu den Versuchen folgende: Fuchsin, Sulfofuchsin, Vinulin (Mischung von Ponceau- und Bordeauxrot), Ponceau, Bordeauxrot, Naphtholgelb S, Martiusgelb, Brillantgrün, Jodgrün, Malachitgrün, Methylenblau. Die Farbstoffe wurden gemäß den bei den aufgeführten Lebensmitteln am häufigsten vorkommenden Fälschungen zugesetzt (in Mengen von 0,01 g auf 100 g). Es ergab sich, daß in den alkoholischen Flüssigkeiten die meisten Farbstoffe nicht zersetzt wurden; bei der Zersetzung von Eiweiß wurden alle Farbstoffe zerstört. Die Zerstörung geschah in nachstehender zeitlicher Reihenfolge: 1. Fuchsin und Sulfofuchsin; 2. Jodgrün, Brillantgrün und Malachitgrün; 3. Methylenblau; 4. Naphtholgelb S; 5. Vinulin, Ponceau, Bordeauxrot, Martiusgelb. Fuchsin war in etwas mehr als 1 Monat verschwunden. Bordeauxrot und Martiusgelb hielten sich etwa 6 Monate.

## II. Spektroskopischer Nachweis von Farbstoffen.

Die Frage, ob ein Lebensmittel überhaupt künstlich gefärbt ist, läßt sich in den meisten Fällen auf chemischem Wege entscheiden. Oft kann es aber auch notwendig sein, festzustellen, welcher Farbstoff zum Färben verwendet wurde, besonders dann, wenn die Schädlichkeit oder Unbedenklichkeit einer künstlichen Färbung für die Beurteilung eines Nahrungsmittels maßgebend ist. In diesem Falle ist die chemische Analyse vielfach unzureichend; alsdann kann die spektroskopische Prüfung als wertvolle Ergänzung der chemischen in Anwendung kommen, zumal sie vor letzterer den Vorzug der leichteren und schnelleren Ausführbarkeit besitzt. Ferner macht sich auch bei ihr der Nachteil, daß man es meist nur mit sehr geringen Farbstoffmengen zu tun hat, wodurch die chemische Untersuchung sehr erschwert werden kann, nicht so störend bemerkbar, da im allgemeinen sehr verdünnte Lösungen für die Spektralanalyse ausreichend bzw. notwendig sind.

### 1. Grundlagen der spektroskopischen Untersuchung.

Über die Grundlagen der Absorptionsspektroskopie s. S. 333. Die Lösungen der Farbstoffe lassen je nach ihren optischen Eigenschaften nur Lichtstrahlen bestimmter Wellenlängen durch. Beobachtet man solche Lösungen mittels eines mit weißem Licht beleuchteten Spektroskops, so beobachtet man, daß das Spektrum in seinem sichtbaren Teile durch einen oder mehrere, für die einzelnen Farbstoffe typische Absorptionsstreifen unterbrochen ist, so daß man je nach deren Zahl, Lage und Beschaffenheit auf bestimmte Farbstoffe schließen kann.

<sup>1</sup> L. GRÜNHUT: Zeitschr. öffentl. Chem. 1898, 4, 563.

<sup>2</sup> C. ZULKOWSKY: Ann. Chem. 1878, 194, 109.

<sup>3</sup> A. CUTOLO: Rev. intern. falsif. 1902, 15, 17; Z. 1904, 7, 711.

J. FORMÁNEK<sup>1</sup> hat die Absorptionsspektren der verschiedenen Farbstoffe im sichtbaren Spektrum einer eingehenden Untersuchung unterzogen und Tabellen aufgestellt, die zum Nachweise der einzelnen Farbstoffe dienen können. Er teilt die Farbstoffe nach der Farbe und Form ihrer Absorptionsspektren in einzelne Gruppen und Untergruppen. Für die Einteilung in die Gruppen sind die Unterschiede in der Zahl und Form der Absorptionsbanden maßgebend und zur näheren Kennzeichnung der einzelnen Farbstoffe dienen die Unterschiede in der Lage der Absorptionsstreifen im Spektrum sowie ihr Verhalten gegen Säure oder Alkali.

Über die Ausführung der Untersuchung siehe S. 334. Im einzelnen ist dafür folgendes zu beachten.

#### a) Apparatur.

Der zur Untersuchung dienende Spektralapparat muß eine passende Dispersion besitzen; diese darf nicht zu groß sein, damit die Absorptionsstreifen sich nicht zu sehr ausdehnen und durch Kontrastverringering wenig intensive Banden nicht mehr wahrgenommen werden können.

Ein hierzu geeigneter Apparat ist das Gitterspektroskop von ZEISS<sup>2</sup> (S. 306).

#### b) Einflüsse auf das Spektrum.

Über die Einflüsse der Lösungsmittel, der Konzentration der Lösung, der Schichtdicke und der Temperatur auf die Absorptionsspektren siehe S. 338. Ergänzend dazu sei noch auf folgendes hingewiesen:

a) Alle Lösungsmittel (Wasser, Äthylalkohol und Amylalkohol), welche bei der spektroskopischen Untersuchung zur Verwendung kommen, müssen chemisch rein und neutral sein, da oft schon Spuren von freier Säure oder freiem Alkali das Spektrum ändern können. Der als Lösungsmittel zu verwendende Amylalkohol darf mit Kalilauge keine Gelbfärbung zeigen, da hierdurch das Spektrum beeinflußt wird.

b) An Reagenzien kommen für die Farbstoffuntersuchung in Betracht: für Pflanzenfarbstoffe Schwefelsäure 1:5, Essigsäure 1:5 und Alaun 1:12, für Teerfarbstoffe: Salzsäure 1:5, wäßrige und alkoholische Kalilauge 1:10, Ammoniak 1:5 (Spez. Gew. 0,96). Zur Vermeidung eines Überschusses an Reagens werden die Lösungen zweckmäßig aus Tropfgläsern zugesetzt.

c) Die möglichst klare und durchsichtige, völlig homogene Lösung wird in verschiedener Konzentration beobachtet, indem man sie mit dem Lösungsmittel allmählich so weit verdünnt, bis die Absorptionsstreifen deutlich hervortreten. Die Spektren setzen sich meistens aus mehreren Streifen, Haupt- und Nebenstreifen, zusammen, welche, je nachdem ihr Dunkelheitsmaximum in der Mitte oder auf einer Seite liegt, symmetrisch oder unsymmetrisch sein können.

Da bei der Verdünnung der gefärbten Lösung in der Regel keine Verschiebung, sondern nur ein Schmalwerden der Streifen eintritt, so verdünnt man, um die Lage der einzelnen Dunkelheitsmaxima genau bestimmen zu können, so weit, bis die Streifen möglichst schmal erscheinen und noch eben sichtbar sind, so daß sie bei weiterer Verdünnung aus dem Spektrum verschwinden würden. Sind die Streifen des Spektrums nicht gleich stark, so bestimmt man zunächst den schwächsten, dann bei stärkerer Verdünnung den nächsten Streifen und so fort. Nachdem die Lage der Absorptionsstreifen bestimmt ist, teilt man die Lösung in 3 Tle., fügt zu dem ersten einige Tropfen Salzsäure 1:5, zum zweiten Ammoniak 1:5 und zum dritten Kalilauge 1:10 hinzu und stellt die hierbei eintretenden Veränderungen fest. Da bei manchen Farbstoffen die Reaktionen erst nach einiger Zeit eintreten, so lasse man die mit dem Reagens versetzte Lösung, wenn sie sich nicht sofort verändert hat, einige Zeit stehen.

Die Lage des Dunkelheitsmaximums der Absorptionsstreifen ist im allgemeinen nicht von der Konzentration der Lösung abhängig, man kann daher auch die Verdünnung

<sup>1</sup> J. FORMÁNEK: Z. 1899, 2, 260. — J. FORMÁNEK: Untersuchung und Nachweis organischer Farbstoffe auf spektroskopischem Wege, 2. Aufl. Berlin: Julius Springer 1908—1927.

<sup>2</sup> Siehe F. LÖWE: Chem.-Ztg. 1922, 46, 465. — Hersteller des Apparates ist die Firma C. Zeiss in Jena.

teilweise durch Beobachtung in geringerer Schichtdicke ersetzen; s. BEERSches Gesetz S. 344. Dies trifft jedoch natürlich nicht zu, wenn der Farbstoff durch stärkere Verdünnung stärker hydrolysiert oder verändert wird, da in solchen Fällen eine Verschiebung der Streifen eintreten kann.

d) Bei der spektroskopischen Untersuchung der Farbstoffe hat sich ergeben, daß die Spektren eine gewisse Regelmäßigkeit zeigen, so daß sich eine Anzahl von Typen aufstellen läßt, nach denen sich die Farbstoffe in bestimmte Gruppen ordnen. Das Spektrum kann nämlich entweder aus einem symmetrischen oder unsymmetrischen Streifen bestehen, oder es kann aus zwei oder drei Streifen verschiedener Form und Stärke zusammengesetzt sein oder endlich eine nach dem einen Ende des Spektrums allmählich zunehmende einseitige Absorption zeigen. Sind aber zwei oder mehr Farbstoffe, welche sich chemisch gegenseitig nicht beeinflussen, gleichzeitig in einer Lösung vorhanden, so kann das Mischspektrum verschieden ausfallen. Liegen die Absorptionsstreifen nicht nahe beieinander, so ist das Spektrum ein reines Mischspektrum, d. h. es zeigt alle einzelnen Streifen der vorhandenen Farbstoffe. Liegen die Streifen aber nahe beieinander, so kommt es mitunter vor, daß nur derjenige Absorptionsstreifen erscheint, dessen Intensität die größte ist; oder es bildet sich aus zwei Streifen ein neuer Streifen, dessen Dunkelheitsmaximum in dem Zwischenraume zwischen beiden Streifen, und zwar näher bei dem stärkeren liegt. Endlich kann auch das Absorptionsspektrum eines Stoffes durch den Einfluß eines anderen Stoffes in seinem Typus zwar erhalten bleiben, jedoch aus seiner Lage verschoben werden, so daß sich die Streifen auch voneinander entfernen können. Durch derartige Einwirkungen wird natürlich die Auffindung der einzelnen Farbstoffe erschwert oder auch ganz unsicher gemacht, jedoch leisten in diesen Fällen die Reaktionen mit Säuren oder Alkalien oft gute Dienste.

e) Die Regelmäßigkeit in der Anordnung der Absorptionsstreifen bietet zuweilen ein gutes Mittel, um zu entscheiden, ob ein vorliegender Farbstoff einheitlich oder ein Gemisch ist. Ein solches liegt stets bei einer unregelmäßigen Anordnung der Streifen vor, z. B. wenn neben einem starken Streifen ein schwacher und dann wieder ein starker erscheint, weil eine solche Anordnung bei einheitlichen Farbstoffen nicht vorkommt. Ein wichtiges Merkmal für die Einheitlichkeit eines Farbstoffes ist auch die gleichmäßige Änderung, z. B. ein Verschieben oder Verschwinden, aller im Spektrum vorhandenen Streifen bei Zusatz von Reagenzien.

f) Auf die Gestalt des Spektrums und die Lage der Absorptionsstreifen hat die Temperatur der Lösung keinen nennenswerten Einfluß, soweit nicht eine Veränderung bzw. Umsetzung des Farbstoffes selbst eintritt. Dagegen kann das Lösungsmittel einen sehr erheblichen Einfluß ausüben, indem z. B. ein Farbstoff in wäßriger Lösung nur einen, in alkoholischer Lösung dagegen zwei Streifen aufweist. Beim Malachitgrün ist die Form des Spektrums in allen Lösungsmitteln die gleiche, dagegen ändert sich die Lage der Dunkelheitsmaxima in den verschiedenen Lösungsmitteln. Auch kann sich der Farbstoff in verschiedenen Lösungsmitteln mit verschiedener Farbe lösen, wobei natürlich auch die Spektren ganz andere werden können.

### c) Herstellung der Untersuchungslösung.

Als Lösungsmittel für die zu untersuchenden Farbstoffe kommen Wasser, Äthyl- und Amylalkohol in Anwendung<sup>1</sup>; jede dieser Lösungen wird mit Salzsäure, wäßriger oder alkoholischer Kalilauge und Ammoniak (S. 1204) behandelt.

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln muß der Farbstoff zunächst in geeigneter Weise daraus isoliert werden.

Aus festen Gegenständen wird der Farbstoff mit Wasser, Äthyl- oder Amylalkohol, nötigenfalls unter Zusatz von etwas Essigsäure oder Salzsäure oder auch unter schwacher Erwärmung ausgezogen. Zuckerwaren kann man im allgemeinen in Wasser lösen und direkt spektroskopisch untersuchen. Flüssigkeiten wie Fruchtsäfte, Liköre usw., können gleichfalls zur Orientierung zunächst direkt geprüft werden. Zur Isolierung des Farbstoffes dampft man auf dem Wasserbade ein und verdünnt dann zur Abscheidung des Zuckers mit absolutem Alkohol. Mitunter kann man auch den Farbstoff durch Ausschütteln mit Amylalkohol, nötigenfalls nach schwachem Ansäuern (S. 1180), gewinnen, oder man bedient sich auch mit Vorteil der Ausfärbung auf Baumwolle oder Wolle (S. 1178) und bringt nachher den Farbstoff durch Auskochen der Faser mit verd. Äthylalkohol, verd. Schwefelsäure, konz. Essigsäure oder einem Gemisch von gleichen Teilen Anilin und Essigsäure in Lösung. Um einen beim Ausfärben etwa gleichzeitig auf der Wolle

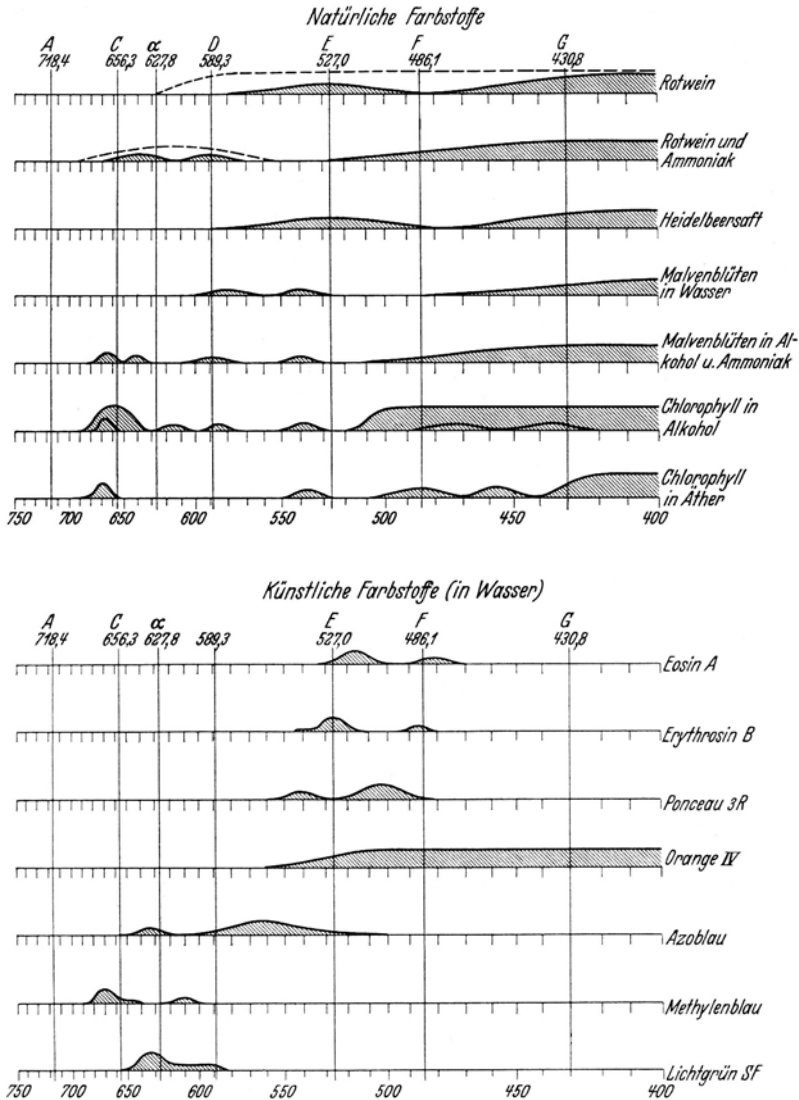
<sup>1</sup> Bei manchen Farbstoffen auch konz. Essigsäure und konz. Schwefelsäure.

mit niedergeschlagenen Pflanzenfarbstoff zu entfernen, wird die ausgefärbte Wolle mit verd. Weinsäurelösung abgewaschen und mit wäßriger Quecksilberchloridlösung (1:9) auf dem Wasserbade kurze Zeit erwärmt (S. 1182); auf der Wolle bleibt dann nur der Teerfarbstoff zurück. Farbstoffe der Hölzer werden nach diesem Verfahren nicht beseitigt.

**d) Darstellung der Untersuchungsergebnisse.**

Die Darstellung der spektroskopischen Untersuchungsergebnisse kann auf folgende Weise erfolgen:

**Absorptionskurven von Farbstoffen.**



$\alpha$ ) Eine nur oberflächliche Charakteristik der Absorptionsstreifen von Farbstoffspektren gibt die Darstellung in Form von nach dem Augenschein aufgenommenen Kurven nach R. BUNSEN (S. 336). Diese Art der Darstellung

hat auch J. FORMÁNEK bei seinen qualitativen Versuchen zum Nachweise von Farbstoffen angewendet. Einige Beispiele dieser Darstellung enthält die Abbildung auf S. 1203.

β) Man gibt die Lage der Dunkelheitsmaxima der Absorptionsstreifen in Wellenlängen ( $\lambda$ ) an, und zwar in fettgedruckten Zahlen für die Wellenlängen der Hauptstreifen und in gewöhnlichen Zahlen für die der Nebenstreifen.

Tabelle 8. Absorptionsspektren natürlicher Farbstoffe<sup>1</sup>.

| Bezeichnung<br>des Farbstoffes | In Wasser   |                                 |                       | In Äthylalkohol                              |                                 |                        |
|--------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------|--|---------------------------------|------------------------|
|                                | neutral   | + NH <sub>3</sub>               | + KOH                 | neutral                                      | + NH <sub>3</sub>               | + alkohol.<br>KOH.     |
| a) Rote Farbstoffe.            |   |                                 |                       |  |                                 |                        |
| Rotwein . . .                  | 527,0<br>br. v. St.   | 643,0—637,0<br>592,0—587,0      |                       | —  | —                               | —                      |
| Kirschen . . .                 | 520,5<br>br. St.  | 587,0                           | 630,5—593,5<br>v. St. | 547,5<br>br. St.                             | (Grüner Niederschlag)           |                        |
| Himbeeren . .                  | 516,0<br>br. v. St.   | 591,0<br>v. St.                 | 604,5<br>v. St.       | 541,5  | (Grauer N.)                     | (Grüner N.)            |
| Johannisbeeren.                | 523,0<br>br. v. St.   | etwa 600                        |                       | 543,5<br>br. v. St.                          | (Grauer Niederschlag)           |                        |
| Brombeeren . .                 | 518,5<br>br. St.  | 596                             | 642                   | 545,5  | (Grüner Niederschlag)           |                        |
| Heidelbeeren . .               | 536,0<br>br. St.  | 605,8<br>schw.                  | 617,5                 | 553,5  | 638,5<br>593,5                  | (Grüner N.)            |
| Hollunderbeeren                | 574,5   | 629,0                           | 632,0                 | —  | —                               | —                      |
| Malvenblüten                   | 578,0<br>540,0  | 622,5                           | 630,5                 | 572,0<br>535,5<br>v. St.                     | 663,5; 643,0<br>587,0; 538,5    | (Grüner N.)            |
| Rote Rüben . .                 | 544,5<br>483,0<br>454,5   | Streifen<br>verschwinden        |                       | 546,5; 481,3<br>453,0                        | 547,5; 480,0<br>452,0           | (Trübung)              |
| Alkana . . .                   | —   | —                               | —                     | 523,1; 563,8;<br>545,0; 487,1;<br>456,0      | —                               | 634,4; 584,5;<br>542,5 |
| b) Gelbe Farbstoffe.           |   |                                 |                       |  |                                 |                        |
| Safran . . . .                 | 475,1; 443,9  |                                 | 465,0<br>438,0        | 462,0; 434,3                                 |                                 | 456,5<br>431,5         |
| Saflor . . . .                 | Einseitige Absorption in Blau<br>und Violett  |                                 |                       | —  | —                               | —                      |
| In Amylalkohol                 |   |                                 |                       |  |                                 |                        |
| Orlean . . . .                 | 496,5<br>463,5<br>436,5   | 491,5; 458,5; 433,5<br>(v. St.) |                       | 494,0<br>461,0<br>434,5                      | 487,5; 456,0; 431,5<br>(v. St.) |                        |
| c) Grüner Farbstoff.           |   |                                 |                       |  |                                 |                        |
| Chlorophyll . .                | In Äther<br>Breiter Streifen in Rot; ferner<br>612,6; 577,0; 533,9; 506,4<br>(Konz. Lösung) |                                 |                       | 664,2; 614,1; 584,5; 537,5<br>(Konz. Lösung) |                                 |                        |

<sup>1</sup> Abkürzungen: A. = Absorption; E. = Entfärbung; L. = Lösung; N. = Niederschlag; St. = Absorptionsstreifen; Tr. = Trübung; br. = breit; schw. = schwach; u. = unverändert; v. = verwaschen.

γ) Die exakteste Darstellung der Versuchsergebnisse ist diejenige durch Absorptionskurven, indem z. B. die Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge oder von einer Funktion dieser kurvenmäßig dargestellt werden. Dies setzt voraus, daß die Absorption mittels eines Spektralphotometers, das eine Kombination von Spektroskop und Photometer darstellt (S. 344), für möglichst viele Wellenlängen quantitativ bestimmt wird.

## 2. Absorptionsspektren natürlicher Farbstoffe.

Die Absorptionsspektren der natürlichen Farbstoffe, z. B. der Fruchtsäfte, besitzen namentlich in Gemischen keinen besonderen diagnostischen Wert; sie können aber immerhin gelegentlich die chemischen Befunde (S. 1186) unterstützen.

Die Absorptionsspektren einiger der wichtigsten natürlichen Farbstoffe enthält die Tabelle 8 auf S. 1204.

## 3. Absorptionsspektren künstlicher Farbstoffe.

Trotz der großen Einfachheit des Prinzips der spektroskopischen Untersuchung der künstlichen Farbstoffe hat das Verfahren in der Praxis bisher nur wenig Anwendung gefunden, da es, namentlich bei der Untersuchung von Farbstoffgemischen — über deren Erkennung auf chemischem Wege s. S. 1191 — immerhin gewisse Schwierigkeiten bietet. Trotzdem können aber solche Gemische durch die Veränderungen, welche die Spektren beim Zusatz von Reagenzien zu den Lösungen erfahren, als solche erkannt werden.

Bei der großen Zahl künstlicher Farbstoffe, die sich im Handel finden und deren Zahl sich ständig noch vermehrt, kann hier nicht das spektroskopische Verhalten aller dieser Farbstoffe dargestellt werden; es sollen vielmehr in der Tabelle 9 auf S. 1206 nur die Absorptionsspektren einiger namentlich für die Färbung von Lebensmitteln in Frage kommenden Farbstoffe als Beispiele angegeben werden. Wer sich eingehender mit dem Nachweise der künstlichen Farbstoffe auf spektroskopischem Wege beschäftigen will, sei auf das grundlegende Werk von J. FORMÁNEK (S. 1201) verwiesen.

Im einzelnen sei über die spektroskopische Untersuchung noch auf folgendes hingewiesen: Die Absorptionsstreifen der einzelnen Farbstoffe liegen im Bereiche ihrer Komplementärfarben des Spektrums:

| Farbstoffe                               | Wellenlänge<br>( $\lambda$ ) | Lage des Absorptions-<br>streifens im |
|--|------------------------------|---------------------------------------|
| grüne und blaugrüne . . . . .            | 723—629                      | Rot                                   |
| blaue und blauviolette . . . . .         | 629—585                      | Orange                                |
| violette und rotviolette . . . . .       | 585—575                      | Gelb                                  |
| violettrote, rote und gelbrote . . . . . | 575—485                      | Grün                                  |
| orange gelbe . . . . .                   | 485—455                      | Blau                                  |
| gelbe . . . . .                          | 455—424                      | Indigo                                |
|  | ab 424                       | Violett                               |

Manche gelben Farbstoffe geben weder für sich noch mit Reagenzienzusatz charakteristische Absorptionsspektren; für sie kommt daher der spektroskopische Nachweis nicht in Betracht. Ebenso sind Mischungen von Azofarbstoffen meist nicht analysierbar, weil viele von ihnen in Wasser, Äthyl- oder Amylalkohol gelöst, breite unscharfe Absorptionsstreifen zeigen, wodurch bei den Gemischen Spektren von unbestimmtem Charakter entstehen.

Tabelle 9. Absorptionsspektren von künstlichen Farbstoffen<sup>1</sup>.

| Nr.                             | Farbstoff                      | In Wasser             |                       | In Äthylalkohol       |                       | In Amylalkohol        |                       |                       |                  |              |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------|
|                                 |                                | neutral               | + HCl                 | + KOH                 | neutral               | + HCl                 | + KOH                 | neutral               | + HCl            | + KOH        |
| a) Rote Farbstoffe.             |                                |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                  |              |
| 1                               | Erythrosin B.                  | 524,3; 489,1          | E. N.                 | u.                    | 535,3; 496,2          | E.                    | 528,8; 494,0          | 542,2; 503            | E.               | 532,4; 495,5 |
| 2                               | Phloxin P . .                  | 536,6; 497,5          | E.                    | u.                    | 548,0; 506,8          | E.                    | u.                    | 550,0; 508,5          | E.               | 547,5; 507,0 |
| 3                               | Ponceau 2 R.                   | 539,2; 501,5          | St. ver-<br>schwinden | St. ver-<br>schwinden | 535,3; 500,0          | St. ver-<br>schwinden | St. ver-<br>schwinden | 539,2; 503,0          | —                | —            |
| 5                               | Amaranth . .                   | 524,3                 | desgl.                | desgl.                | 509,1 v.              | St. ver-<br>schwinden | St. ver-<br>schwinden | 509,1 v.              | —                | —            |
| 6                               | Bordeaux BL.                   | 522,5 v.              | desgl.                | desgl.                | 524,3 v.              | desgl.                | desgl.                | (unlöslich)           | 524,3 v.         | —            |
| 7                               | Fuchsin . . .                  | 546,5; 487,5          | 578,3                 | E.                    | 554,6; 502,0          | E.                    | E.                    | 557,8; 505,0          | A.<br>geschwächt | E.           |
| 8                               | Säurefuchsin .                 | 550,0; 492,5          | —                     | E.                    | 558,2; 506,0          | E.                    | E.                    | —                     | 562,8; 509,0     | —            |
| 9                               | Eosin, wasserl.                | 518,0; 484,0          | E.                    | 518,0; 484,0          | 529,5; 491,0          | E.                    | 525,0; 488,8          | 531,5; 493,0          | E.               | 527,6; 490,6 |
| 10                              | Eosin, spritl. .               | 523,5; 487,4          | E.                    | 523,5; 487,4          | 538,0; 499,2          | E.                    | 538,0; 499,2          | 541,2; 501,6          | E.               | 537,9; 499,4 |
| b) Orange und gelbe Farbstoffe. |                                |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                  |              |
| 13                              | Tropäolin 000<br>Nr. 1 . . . . | 482,8 v.              | —                     | 514,1                 | 478,9                 | —                     | 524,3 v.              | 478,9 v.              | —                | 524,3 v.     |
| 14                              | Chrysoidin . .                 | Einseitige A. in Blau | —                     | —                     | Einseitige A. in Blau | —                     | —                     | Einseitige A. in Blau | —                | —            |

|    |                |                                      |              |   | 514,0; 485,0 v.    | 515,0; 486,0 v.                      | St. ver-<br>schwinden                                      |
|----|----------------|--------------------------------------|--------------|---|--------------------|--------------------------------------|--|
| 15 | Sudan I . . .  | —                                    | —            | —   | 514,0; 485,0 v.    |                                      | St. ver-<br>schwinden                                      |
| 16 | Buttergelb O . | —                                    | —            | 513<br>Einseitige A.<br>in Blau-<br>violett | 512,5; 486,0<br>v. | 514,5                                | 513,5; 488,0<br>v.<br>St. in Grün<br>v.                    |
| 17 | Säuregelb R .  | Einseitige A.<br>in Blau-<br>violett | 516,0; 492,0 | Einseitige A.<br>in Blau-<br>violett        | 526,0; 495,5<br>v. | Einseitige A.<br>in Blau-<br>violett | 531,0; 500,0<br>v.<br>Einseitige A.<br>in Blau-<br>violett |
| 18 | Naphtholgelb S | desgl.<br>in Blau                    | E.           | desgl.<br>in Blau                           | E.                 | desgl.<br>in Blau                    | E.<br>desgl.<br>in Blau                                    |
| 21 | Auramin O . .  | Einseitige A. in Blau-<br>violett    |              | Einseitige A. in Blau-<br>violett           |                    | Einseitige A. in Blau-<br>violett    |  |

c) Violette und grüne Farbstoffe.

|    |                 |              |                   |         |              |              |              |    |
|----|-----------------|--------------|-------------------|---------|--------------|--------------|--------------|----|
| 27 | Methylviolett . | 585,7; 534,8 | 623,9;<br>dann E. | E.      | 585,0; 540,5 | 585,0; 543,5 | 588,3; 543,5 | E. |
| 28 | Lichtgrün . .   | 627,8        | A.<br>geschwächt  | E.      | 629,5        | —            | 630,5        | —  |
| 29 | Malachitgrün .  | 616,9        | E.                | E., Tr. | 621,0        | 623,3        |              | —  |

<sup>1</sup> Die Nummern und die Abkürzungen sind die gleichen wie in Tabelle 8 auf S. 1204.



# Mineralstoffe.

Von

Professor **DR. A. BÖMER** und **DR. O. WINDHAUSEN**-Münster i. W.

Mit 10 Abbildungen.

Alle natürlichen Lebensmittel enthalten eine Reihe von Mineralstoffen, die von den Pflanzen aus dem Boden aufgenommen und dem Tiere durch das Futter zugeführt werden. Es sind dies an Kationen hauptsächlich Eisen, Aluminium, Mangan, Calcium, Magnesium, Kalium und Natrium und an Anionen vorwiegend Phosphor, Schwefel, Silicium und Chlor.

Daneben enthalten die meisten Lebensmittel als natürliche Bestandteile, ebenfalls meist aus dem Boden bzw. dem Futter stammend, kleine und kleinste Mengen von Kupfer, Zink, Nickel, Arsen, Bor, Jod, Fluor und anderen Stoffen.

Bei der Zubereitung vieler Lebensmittel findet ferner ein Zusatz von Natriumchlorid („Kochsalz“) statt, beim Pökeln auch ein solcher von Kaliumnitrat bzw. Kaliumnitrit, beim Backen ein solcher von Backpulvern mit vorwiegend Alkalien, Calcium und Phosphorsäure usw.

Außerdem werden an anorganischen Konservierungsmitteln gelegentlich Borsäure, Schweflige Säure, Phosphorsäure, Fluor bzw. deren Alkalisalze usw. den Lebensmitteln zugesetzt.

In diesem Abschnitte wird davon abgesehen, die Methoden für den Nachweis der einzelnen Mineralstoffe aufzunehmen, da diese die allgemein in der Chemie angewendeten sind; nur bei den als Konservierungsmittel dienenden Mineralstoffen finden auch die Nachweismethoden Berücksichtigung, und bezüglich des Nachweises und der Bestimmung der sog. metallischen Gifte usw. sei auf den folgenden Abschnitt „Ausmittlung der Gifte“ (S. 1273) verwiesen.

## I. Bestimmung der Gesamt-Mineralstoffe.

Man bestimmt die Mineralstoffe der Lebensmittel in der Regel durch Veraschung und versteht unter „Asche“ die salzartige Masse, die bei der vollständigen Verbrennung der organischen Bestandteile eines Lebensmittels zurückbleibt. Hierbei muß man aber berücksichtigen, daß bei der höheren Verbrennungstemperatur Reaktionen sowohl zwischen den vorgebildeten Mineralstoffen der ursprünglichen Substanz, als auch zwischen den Mineralstoffen und den aus schwefel- und phosphorhaltigen organischen Verbindungen entstandenen Mineralsäuren stattfinden, daß man also in der Asche nicht die Gesamtheit der Mineralstoffe in unveränderter Menge und Bindungsweise vorfindet<sup>1</sup>.

Den Rückstand, welchen man durch einfache Verbrennung („Veraschung“) der Lebensmittel erhält, bezeichnet man als Asche schlechthin oder als Roh-

<sup>1</sup> Über die Veränderungen der Mineralstoffe beim Veraschen siehe B. PFYL: Z. 1922, 43, 313 und 1924, 48, 261. Er empfiehlt, die Werte für die einzelnen Mineralstoffe für 100 g des Stoffes in Val bzw. Millival anzugeben.

asche, namentlich wenn diese neben den aus dem Lebensmittel selbst stammenden Mineralstoffen bzw. deren Umsetzungsprodukten noch Kohleteilchen und, namentlich bei pflanzlichen blattartigen Lebensmitteln, noch mehr oder weniger diesen äußerlich anhaftende erdige Teile (Sand und Ton) enthält, die nicht zu den Mineralstoffen des Lebensmittels gehören. Man bringt daher von der Rohasche ihren Gehalt an Kohle, Sand und Ton in Abzug und bezeichnet den auf diese Weise erhaltenen Wert als Reinasche.

In vielen Aschen finden sich größere Mengen von Carbonaten, die in den Lebensmitteln selbst nicht enthalten waren, sondern sich erst durch den Verbrennungsprozeß, namentlich aus Lebensmitteln mit viel Salzen organischer Säuren, gebildet haben und deren Kohlensäure daher nicht zu den Mineralstoffen der Lebensmittel gehört. Man bestimmt diese Kohlensäure daher gelegentlich nach S. 1211 besonders, bringt ihre Menge von der Reinasche in Abzug und erhält so die kohlenstofffreie Reinasche.

Bei der Veraschung von Lebensmitteln, die organische Salze der alkalischen Erden (Calcium- und Magnesiumsalze) enthalten, entweicht ein Teil der an diese gebundenen, zur Asche gehörigen Kohlensäure. Um diese der Asche wieder zuzuführen, befeuchtet man sie mit wenig Ammoniumcarbonatlösung, dampft zur Trockne und glüht dann schwach, bis das überschüssige Ammoniumcarbonat verflüchtigt ist.

Ferner muß man beachten, daß bei Lebensmitteln, welche viel organische Phosphor- und Schwefelverbindungen, dagegen wenig Kationen enthalten, ein Teil des Phosphors und Schwefels bei der Veraschung entweicht und daher in der Asche nicht erfaßt werden kann. Um die Gesamtmenge des Phosphors und Schwefels zu bestimmen, verascht man solche Substanzen mit alkalischen Zusätzen (S. 1220), oder man schließt sie zur Bestimmung des Phosphors mit konz. Schwefel- und Salpetersäure auf (S. 1221).

## 1. Bestimmung der Asche.

a) **Vorbereitung der Substanz.** Die zu veraschenden Lebensmittel müssen, um gute Durchschnittsproben zu erhalten, hinreichend zerkleinert werden.

α) Flüssigkeiten und wasserreiche Substanzen müssen vor der Veraschung auf dem Wasserbade oder im Trockenschranke von der Hauptmenge des Wassers befreit werden. Bei wasserreichen, ungleichmäßig zusammengesetzten Lebensmitteln, die sich im natürlichen Zustande nicht so weit zerkleinern lassen, daß die zu veraschende kleine Substanzmenge einen genügenden Durchschnitt des Lebensmittels darstellen würde, werden zweckmäßig nach S. 551 vorgetrocknet.

β) Natürliche pflanzliche Lebensmittel, insbesondere Blätter, Kräuter, Wurzelgewächse usw. müssen vor der Veraschung von den ihnen äußerlich anhaftenden erdigen Teilen, Staub usw. möglichst gereinigt werden. Dies geschieht zweckmäßig entweder durch weiche Bürsten oder Pinsel oder, namentlich bei Wurzelgewächsen von lehmigem Boden, durch Abwaschen, zuletzt mit destilliertem Wasser, und darauf folgendes sofortiges Abtrocknen mit einem weichen Tuche.

b) **Veraschungsapparaturen.** In der Regel verwendet man zur Veraschung zunächst Pilzbrenner und darauf gewöhnliche Bunsen- oder Teclu-Brenner, mit denen man am Schlusse der Veraschung die Platinschale umfächelt.

Um diese viel Zeit beanspruchende Umfächelung zu vermeiden, hat man Einrichtungen getroffen, welche die Heizflamme in drehender Bewegung halten. Hierfür sind von G. LOCKEMANN<sup>1</sup> und von W. v. HEYGENDORFF<sup>2</sup> besondere Drehbrenner konstruiert und empfohlen worden. E. J. APS<sup>3</sup> schlägt eine Vorrichtung<sup>4</sup> vor, die den Tiegel, in dem die Veraschung vorgenommen wird, in eine drehende Bewegung setzt, um dadurch eine gleichmäßige Erhitzung des gesamten Tiegelinhaltes zu ermöglichen und gleichzeitig die Gefahr

<sup>1</sup> G. LOCKEMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1921, **34**, 198 und 594.

<sup>2</sup> W. v. HEYGENDORFF: Zeitschr. angew. Chem. 1921, **34**, 359.

<sup>3</sup> E. J. APS: Chem.-Ztg. 1910, **34**, 1374.

<sup>4</sup> Dieser Apparat wird von der Firma Julius Schober in Berlin SO 16 hergestellt.

der Überhitzung auszuschließen. G. LOCKEMANN<sup>1</sup> hat diesen Apparat so abgeändert daß man außer Tiegeln auch Schalen in drehende Bewegung versetzen kann.

Für häufig wiederkehrende und namentlich für Reihenuntersuchungen empfiehlt sich für Aschenbestimmungen die Verwendung von Muffelöfen. An Stelle der Gas-Muffelöfen werden heute vorzugsweise elektrische Muffelöfen<sup>2</sup> verwendet. Sie sind mit in die Muffelwand vollkommen eingebetteten Heizwiderständen aus Platin oder Chromnickel versehen; die erreichbaren Höchsttemperaturen betragen im ersteren Falle etwa 1000° und im zweiten etwa 800°. Die Temperatur kann mit einem Vorschaltwiderstande reguliert werden. Gegen Stromüberlastung ist in den Öfen eine leicht auswechselbare Goldsicherung eingebaut, durch die der Heizstrom fließt. Ein Schornstein bewirkt den erforderlichen, einstellbaren Luftzug.

Bei der Aschenbestimmung im Muffelofen empfiehlt es sich, die organische Substanz zunächst auf einem Pilzbrenner zu verkohlen und dann erst die Platinschale in den Muffelöfen zu stellen.

c) **Ausführung der Bestimmung.** Etwa 5—10 g der lufttrockenen Substanz werden in einer gewogenen Platinschale bei anfangs kleiner Flamme — am besten auf einem Pilzbrenner — verkohlt und dann auf stärkerer Bunsenflamme oder im Muffelofen verascht, bis die Kohle verbrannt ist.

Handelt es sich außer um die Bestimmung der Asche der Substanz auch um die Bestimmung mehrerer Aschenbestandteile, so verascht man in einer geräumigen Platinschale gesondert eine größere Menge (50—100 g) der Substanz, wobei auf eine vollständige Verbrennung aller Kohleteilchen nicht ein so großes Gewicht zu legen ist. Man kann bei der Veraschung größerer Substanzmengen die Verbrennung der Kohle auch dadurch fördern, daß man die verkohlte Masse in der Platinschale mit einem Pistill zerdrückt, letzteres mit Wasser abspült, das Wasser auf dem Wasser- oder Sandbade verdampft, den Rückstand schwach glüht und diese Behandlung nötigenfalls wiederholt.

Zur Beschleunigung der Kohleverbrennung kann man die größtenteils verkohlte und zerdrückte Substanz statt mit Wasser auch mit einer 3%igen Lösung von reinem Wasserstoffsuperoxyd anfeuchten und weiter wie beim Zusatz von Wasser verfahren.

Ferner ist auch die Anwendung eines schwachen Stromes von Sauerstoffgas zur Beschleunigung der Kohleverbrennung empfohlen worden. Das Gas wird aus einem kleinen Gasometer mittels eines Gummischlauches und einer in eine Spitze ausgezogenen Glasröhre in sehr schwachem Strome auf die schwach geglühte kohlehaltige Masse geleitet, indem man die Glasröhrenspitze in der Schale herumführt. In dieser Weise verbrennt die Kohle sehr ruhig, ohne daß viel Sauerstoff verbraucht wird<sup>3</sup>.

Dagegen ist die Verwendung von Ammoniumnitrat, das man in kleinen Mengen der Asche zur Verbrennung der Kohle zusetzen soll, nicht empfehlenswert, weil durch das Verpuffen leicht Verluste an Asche eintreten können.

Im übrigen ist bei der Veraschung verschiedenartiger Stoffe noch folgendes zu beachten:

α) Wenn es sich um die Veraschung sehr trockener, staubfein gepulverter Substanzen handelt, kann es sich empfehlen, diese mit etwas Alkohol anzufeuchten und zunächst ohne Zuführung von Hitze den Alkohol langsam abbrennen zu lassen, damit beim Veraschen keine Verluste durch Verstäubung eintreten.

β) Proteinreiche Stoffe lassen sich sehr schwer veraschen. Man verwendet bei ihrer Veraschung das oben erwähnte Anfeuchten der Asche mit Wasser und erreicht damit bei tierischen Stoffen auch gleichzeitig die Zerstörung der bei der Veraschung gebildeten Cyanverbindungen.

<sup>1</sup> G. LOCKEMANN: Chem.-Ztg. 1920, 44, 283.

<sup>2</sup> Solche Muffelöfen liefern unter andern die Firmen W. C. Heraeus und G. Siebert in Hanau. Da die Einrichtungen der Muffelöfen sich unter anderem auch nach der zur Verfügung stehenden Stromquelle richten müssen, empfiehlt es sich, bei beabsichtigter Anschaffung sich zunächst an die Lieferungsfirmen zu wenden. Aus diesem Grunde wird hier auch von einer Abbildung und näheren Beschreibung solcher Muffelöfen abgesehen.

<sup>3</sup> J. WEBER u. W. KRANZ (Zeitschr. physiol. Chem. 1926, 157, 171) veraschen die Substanz in einem Porzellanschiffchen im Verbrennungsrohr unter Durchleiten eines Sauerstoffstromes bei möglichst niedriger Temperatur.

γ) Fettreiche Stoffe sind leicht verbrennbar. Es empfiehlt sich, erst schwach bis zur Entzündung der entweichenden Dämpfe zu erhitzen, dann die Heizflamme zu entfernen und die Substanz für sich weiter brennen zu lassen; es findet alsdann durch allmähliches Verglimmen der verkohlten Substanz eine fast vollständige Veraschung statt<sup>1</sup>.

δ) Natriumchloridreiche Stoffe, namentlich wenn sie, wie z. B. gesalzene Fleischwaren, daneben noch große Mengen von Proteinen enthalten, verbrennen sehr schwer; dabei ist ein zu starkes Erhitzen bei solchen Stoffen zu vermeiden, weil damit Verluste an Alkalichloriden entstehen können. In solchen Fällen empfiehlt es sich, die bei mäßiger Erhitzung hergestellte Asche mit Wasser auszuziehen. Hierbei kann man in zweierlei Weise verfahren:

αα) Man digeriert die erkaltete Asche auf dem Wasserbade mit etwa 10—20 ccm Wasser, filtriert das Unlösliche durch ein kleines aschefreies Filter ab, wäscht den Rückstand ein- bis zweimal mit Wasser, läßt das Filter kurze Zeit trocknen und verascht es darauf in der Platinschale; hierbei verbrennt das Filter und die ausgelaugte Kohle sehr leicht. Darauf gibt man die wäßrige Lösung zu der Asche in die Schale, dampft auf dem Wasserbade zur Trockne und glüht den Rückstand gelinde. Enthält die Asche viel Natriumchlorid, so können hierbei leicht durch Verknistern von Natriumchloridkryställchen Verluste entstehen; man vermeidet solche durch Aufdecken eines Uhrglases oder eines Platin- oder Nickelbleches.

ββ) Man wägt die Asche (+ Kohle) (a), zieht die Asche auf einem vorher getrockneten und gewogenen aschefreien Filter wiederholt mit Wasser aus, trocknet den kohlehaltigen Rückstand und wägt ihn (b). Darauf verbrennt man Filter + Kohle in einer vorher gewogenen Platinschale vollständig, was jetzt leicht gelingt, und wägt wiederum (c). Dann ist  $a - (b - c) = a - b + c$  der Aschengehalt der Substanz.

d) **Bestimmung der Reinasche.** Da man unter Reinasche nach S. 1209 die Rohasche — (Sand, Ton und Kohle) versteht, verfährt man zunächst wie vorstehend unter ββ) beschrieben, mit dem Unterschiede, daß man die Asche + Kohle nicht mit Wasser sondern mit warmer verd. Salzsäure auszieht. Darauf bestimmt man in analoger Weise den Kohlegehalt ( $b - c$ ) und kocht zur Bestimmung von etwa vorhandenem Sand + Ton den Rückstand c mit einer konz. Natriumcarbonatlösung unter Zusatz von etwas Natronlauge, wodurch die zur Asche gehörige Kieselsäure (namentlich aus spelzenreichen Stoffen) in Lösung geht und Sand und Ton ungelöst bleiben. Diese werden abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen, geglüht und gewogen. Durch Abzug des nach diesem Verfahren gefundenen Sand- + Ton- und des Kohlegehaltes erhält man die Reinasche. Durch Abzug der nach e) ermittelten Kohlensäure erhält man die kohlen-säurefreie Reinasche.

e) **Bestimmung der Kohlensäure der Asche.** Die einfachste Methode zur Bestimmung der Kohlensäure in der Asche ist die indirekte Bestimmung. Für diese ist eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen, von denen die nach GEISSLER-FRÜHLING-SCHULZ und nach SCHRÖTTER die bekanntesten sind. Beide Verfahren sind jedoch im allgemeinen als weniger genau anzusehen, da mit der Kohlensäure auch mehr oder weniger Wasserdampf entweichen und andererseits auch die zum Waschen verwendete Schwefelsäure Wasser aus der Luft anziehen kann. Als einen besonderen Fortschritt muß man daher das Verfahren nach G. WITTIG ansehen, da hierbei ein Erwärmen der Apparatur nicht erforderlich ist und weiter das unangenehme Arbeiten mit der konz. Schwefelsäure fortfällt.

Besser als die indirekten Methoden ist die direkte Bestimmung der Kohlensäure durch Wägung der durch Salzsäure in Freiheit gesetzten und im Natronkalkröhrchen aufgefangenen Kohlensäure nach dem Verfahren von FRESSENIUS-CLASSEN. Dieses Verfahren hat sich in der Praxis allgemein gut bewährt und kann daher empfohlen werden. — Neben diesem gravimetrischen Verfahren hat in neuerer Zeit auch die maßanalytische Bestimmung der Kohlensäure, z. B. nach HEPBURN, Eingang in die Praxis gefunden. Das Verfahren

<sup>1</sup> Vgl. auch P. FORTNER: Z. 1926, 51, 300.

beruht darauf, daß man die durch Säure in Freiheit gesetzte Kohlensäure in Barytlaug auffängt und nach dem Abfiltrieren des Bariumcarbonates die unverbrauchte Barytlaug zurücktitriert.

Bei Stoffen, welche reich an Schwefelverbindungen sind, bilden sich bei der Veraschung infolge Reduktionswirkung der verbrennenden organischen Stoffe vielfach Sulfide, die bei den nachfolgenden Kohlensäurebestimmungsmethoden als Kohlensäure bestimmt werden, wenn der Sulfid-Schwefel nicht vorher oxydiert wird. Die Oxydation kann durch Wasserstoffsperoxyd erfolgen (vgl. S. 1251).

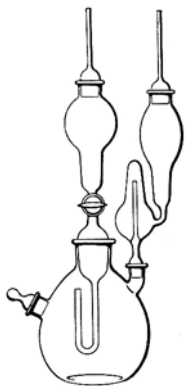


Abb. 1. Kohlensäurebestimmungsapparat nach GEISSLER-FRÜHLING-SCHULZ.

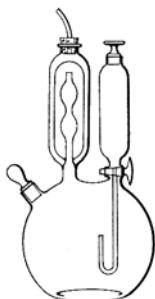


Abb. 2. Kohlensäurebestimmungsapparat nach SCHRÖTTER.

α) Verfahren nach GEISSLER und SCHRÖTTER. Zur indirekten Bestimmung der Kohlensäure ist eine Reihe von Apparaten beschrieben, von denen die nebenstehenden am meisten angewendet zu sein scheinen. Bei dem Apparat nach GEISSLER-FRÜHLING-SCHULZ (Abb. 1) ist das linke Aufsatzrohr mit verd. Salzsäure, das rechte Aufsatzrohr bis zur Hälfte mit konz. Schwefelsäure gefüllt, während bei dem SCHRÖTTERSchen Apparat (Abb. 2) die Aufsatzrohre umgekehrt mit den Säuren gefüllt werden. Wenn die Apparate in dieser Weise beschickt sind, werden sie

gewogen; darauf gibt man durch die mit Glasstöpsel verschlossenen Seitenöffnungen etwa 1 g der gut durchmischten Asche in die Apparate hinein, schließt diese und wägt wieder. Alsdann läßt man durch Öffnen der Hähne an den Aufsatzrohren die Salzsäure zu der Asche fließen, schließt die Hähne wieder und wartet die Kohlensäureentwicklung ab, indem man gegen Ende der Entwicklung schwach erwärmt. Nach dem Erkalten bringt man die Apparate entweder unter eine zu evakuierende Glasglocke oder leitet einen trockenen langsamen Luftstrom durch, bis man sicher sein kann, daß die in den Apparaten noch vorhandene Kohlensäure entfernt ist. Die Apparate werden dann für kurze Zeit geöffnet und bei der Anfangstemperatur zurückgewogen. Der Gewichtsverlust ergibt die Menge Kohlensäure.

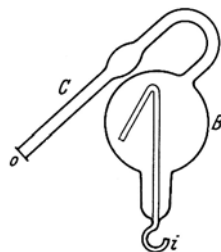


Abb. 3. Kohlensäurebestimmungsapparat nach WITTIG.

β) Verfahren nach G. WITTIG<sup>1</sup>. Er schlägt zur Bestimmung den nebenstehenden einfachen Apparat (Abb. 3) vor. Zur Bestimmung der Kohlensäure wird das Röhrchen C mit feingekörntem, mit Kohlendioxyd gesättigtem Calciumchlorid, das nach 4 Bestimmungen auszuwechseln ist, gefüllt. Durch Ansaugen bei o füllt man die Kugel B zur Hälfte mit etwa 2 N.-Salzsäure, die durch die feine Öffnung i und den im Innern der Kugel B befindlichen

Heber einströmt (selbstverständlich muß am Ende der Füllung der längere Schenkel des Hebers frei von Flüssigkeit sein). In das Rundkölbchen A wägt man etwa 0,2—0,3 g Asche ein und bedeckt sie mit etwa 4 cm Wasser. Darauf setzt man die Kugel B mittels Schliffes auf das Kölbchen A, verschließt o mit einem durchbohrten Kork und wägt den Apparat, den man bei s mit einem Aufhängedraht aus Aluminium umwickeln kann. Zur Bestimmung wird der Apparat bei o mit einem Calciumchloridrohr verbunden, und

<sup>1</sup> G. WITTIG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1925, 58, 1925.

man drückt durch Anblasen mit dem Mund im Lauf von etwa 3 Minuten die Salzsäure in das Kölbchen *A*. Hierauf wird der Apparat bis zur Gewichtskonstanz evakuiert, die durchschnittlich bei der achten Wiederholung eintritt. Zwischen Apparat und Wasserstrahlpumpe schaltet man ein mit konz. Schwefelsäure beschicktes PELIGOT-Rohr und ein Manometer ein. Ein Erwärmen des Kölbchens *A* ist nicht erforderlich. Die ganze Bestimmung dauert etwa 1 bis 1½ Stunden und liefert gute Ergebnisse.

γ) Bestimmung der Kohlensäure nach FRESenius-CLASSEN. Für die Bestimmung verwendet man den in Abb. 4 dargestellten Apparat.

Der Kolben *k* trägt einen doppelt durchbohrten Gummipfropfen; durch dessen eine Öffnung führt ein bis unter den Pfropfen reichendes Rohr zum Kühler *l* und weiter zu den Absorptionsapparaten (*a—e*), durch die andere ein Trichterrohr *t*, dessen Spitze bis nahe auf den Boden des Kolbens reicht und dessen obere Öffnung durch ein mit Natronkalk gefülltes Glasrohr *m* geschlossen wird.

Das PELIGOTSche Rohr *a* ist bis zum unteren Ende der großen Kugeln mit etwa 20 cm konz. Schwefelsäure gefüllt, die Röhre *b* enthält Calciumchlorid<sup>1</sup>, *c* und *d* Natronkalk und *e*

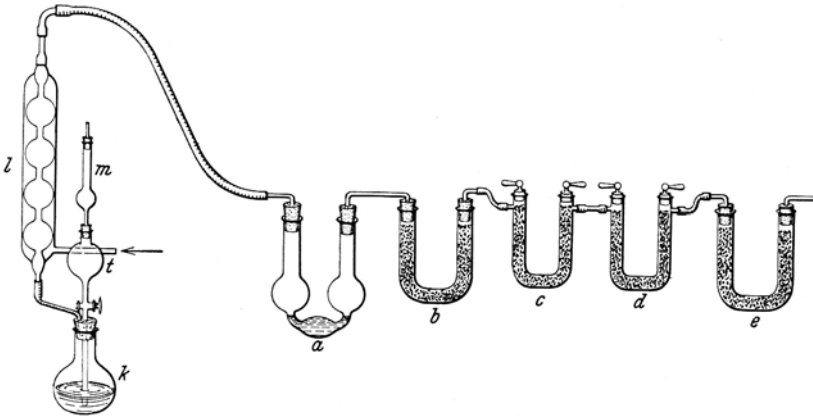


Abb. 4. Apparat zur direkten Bestimmung der Kohlensäure.

zur Hälfte Natronkalk, zur Hälfte Calciumchlorid. Das mit Natronkalk gefüllte Glasrohr *m* soll die zutretende Luft von Kohlensäure befreien; der Kühler dient zur Verdichtung der Wasserdämpfe, die Röhre *a* und *b* sollen die letzten Reste Wasserdampf beseitigen, während das Rohr *e* den Zutritt von Wasser und Kohlensäure zu *d* abhält. Die Röhren *c* und *d* dienen zur Bindung der entwickelten Kohlensäure; sie werden daher vor und nach dem Versuch gewogen. Der Natronkalk in dem Rohre *c* bindet die Kohlensäure, wenn die Entwicklung nicht gar zu rasch vor sich geht, sehr vollkommen, so daß das zweite Natronkalkrohr *d* meistens kaum eine Gewichtsvermehrung zeigt. Auch kann man die Röhre *c* und *d* für mehrere Versuche — bis sechs und mehr, je nach den entwickelten Mengen Kohlensäure — benutzen; erst wenn das Rohr *d* einige Milligramm Gewichtszunahme zeigt, muß der Natronkalk in dem Rohre *c* erneuert werden.

Man kann natürlich auch konz. Kalilauge im LIEBIGSchen Kaliapparat zur Bindung der Kohlensäure verwenden, indes hat Kalilauge den Übelstand, daß sie beim Stoßen der Flüssigkeit, was mitunter stattfindet, leicht verspritzt kann.

Die gewogene Asche (etwa 1 g) wird in den Kolben *k* eingefüllt. Nachdem die Verbindungen des Apparates hergestellt sind, läßt man aus dem Trichterrohr *t* die verd. Salzsäure durch dessen Glashahn zufließen, schließt letzteren

<sup>1</sup> Man verwendet gekörntes Calciumchlorid in hirsekorngroßen Stückchen, das vor dem Gebrauch, da es häufig alkalisch ist, nach DENNSTEDT (Anleitung zur vereinfachten Elementaranalyse, III. Aufl., S. 28) mit Kohlensäure behandelt werden muß. Zu diesem Zwecke leitet man durch das Rohr *B* nach dem Füllen mit Calciumchlorid und vor dem Zusammenstellen des Apparates etwa 1 Stunde lang Kohlensäure, läßt diese nach Verschießen des Rohres über Nacht einwirken und verdrängt dann den Überschuß der Kohlensäure durch Luft.

wiederum und erwärmt den Kolben *k* mit kleiner Flamme, so daß nur langsam und gleichmäßig Gasblasen sich entwickeln; den Gang der Gasentwicklung beobachtet man in dem mit konz. Schwefelsäure beschickten Rohr *a*.

Wenn nach einigem Kochen der Flüssigkeit die Gasentwicklung aufhört und die Flüssigkeit in Rohr *a* zurückzusteigen beginnt, entfernt man für einen Augenblick die Flamme unter dem Kolben *k*, verbindet mit einem Aspirator, öffnet den Hahn am Trichterrohr *t* und leitet so lange — etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde — einen schwachen Luftstrom durch, bis alle Kohlensäure aus dem Apparat entfernt und durch die Natronkalkrohre *c* und *d* zur Bindung gelangt ist. Während des Durchleitens der Luft kann der Inhalt in Kolben *k* anfangs durch eine kleine Flamme bei gutem Kühlen schwach erwärmt werden, um die Entfernung der Kohlensäure aus dem Kolben und Kühler usw. zu unterstützen. Der Inhalt der Rohre *m*, *b* und *e* braucht nur zeitweise nach wiederholter Benutzung erneuert zu werden. Die konz. Schwefelsäure im Rohre *a* dagegen erneuert man zweckmäßig nach je 2—3 Bestimmungen.

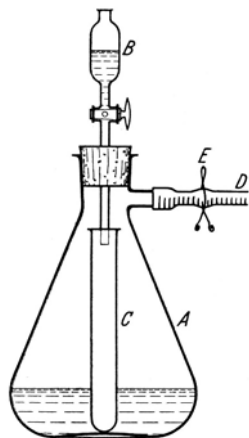


Abb. 5.  
Kohlensäurebestimmungs-  
apparat nach HEPBURN.

Die mit Glashähnen versehenen Rohre *c* und *d* werden nach Beendigung des Versuches weggenommen, geschlossen etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde beiseitegestellt, dann kurze Zeit geöffnet, wieder geschlossen und gewogen. Die Gewichtszunahme ergibt die Menge Kohlensäure.

Wenn es auf eine ganz genaue Bestimmung des Chlors nicht ankommt und dasselbe in der ohne Zusatz von Natriumcarbonat und Natronlauge bzw. Barythydrat oder Kalkmilch dargestellten Asche bestimmt werden soll, so kann man die Kohlensäure auch statt mit Salzsäure mit salzsäurefreier Salpetersäure austreiben und im Filtrat der salpetersauren Lösung nach Ermittlung der Kohlensäure das Chlor durch Fällung mit Silbernitrat bestimmen.

d) Bestimmung der Kohlensäure nach J. R. I. HEPBURN<sup>1</sup>. Der Apparat zur Bestimmung der Kohlensäure (Abb. 5) besteht aus einem Filtrationskolben *A* von etwa 750 ccm Inhalt mit aufgesetztem 50 ccm fassenden Scheidetrichter *B*. In dem Kolben befindet sich ein aufrecht stehendes Reagenzrohr *C*, in welches die Röhre des Scheidetrichters hineinragt, während ein mit Schraubenquetschhahn *E* versehener Vakuumschlauch *D* den Apparat vervollständigt. Die aus der Asche in Freiheit gesetzte Kohlensäure wird von der Barytlauge in *A* absorbiert, deren Überschuß mit Oxalsäurelösung zurücktitriert wird. 0,15 bis 0,3 g der Asche werden in das Reagenzrohr *C* gebracht und mit kohlendioxidfreiem Wasser überschichtet. In den Kolben *A* gibt man etwa 50 ccm 0,1 N.-Barytlauge, bringt das Reagenzglas in die richtige Stellung und setzt den mit gut eingefettetem Stopfen versehenen Scheidetrichter, der mit kohlendioxidfreier 3 N.-Salzsäure gefüllt ist, auf. Darauf verbindet man den Kolben bei *D* mit einer Wasser- oder Luftpumpe, evakuiert bis auf 2 cm Quecksilberdruck und schließt den Hahn. Man läßt nun die Säure vorsichtig zu der Asche in das Reagenzrohr eintropfen. Das entwickelte Kohlendioxid füllt das Vakuum und wird von der Barytlauge rasch absorbiert. Tritt nach weiterem Zusatz von Salzsäure keine Kohlendioxidentwicklung mehr ein, so titriert man nach 12—24 Stunden das überschüssige Bariumhydroxyd mit 0,1 N.-Oxalsäure und Phenolphthalein. Als Endreaktion ist derjenige Punkt anzunehmen, bei welchem

<sup>1</sup> J. R. I. HEPBURN: *Analyst* 1926, 51, 622. — Vgl. ferner auch D. D. VAN SLYKE: *Journ. Biol. Chem.* 1918, 36, 351; C. 1919, II, 642. — U. BOKLUND: *Biochem. Zeitschr.* 1931, 233, 478. — J. LINDNER u. FR. HERULER (*Mikrochemie* 1930, 191) haben die Bestimmung der Kohlensäure nach diesem Prinzip zu einer Mikromethode ausgearbeitet.

keine Färbung mehr wahrzunehmen ist, da die ursprüngliche Farbe vor Beendigung der Titration plötzlich in eine schwache Färbung übergeht. Die Oxalsäurelösung wird als Normallösung bereitet und vor dem Gebrauch mit kohlendioxidfreiem Wasser auf 0,1 N.-Lösung verdünnt. Auch bei geringen Substanzmengen erhält man Ergebnisse mit einer Genauigkeit von 0,5%.

ε) Mikrochemische Bestimmung der Kohlensäure nach W. REICH-ROHRWIG<sup>1</sup>. Die vorgeschlagene gravimetrische Mikromethode zur Bestimmung der Kohlensäure beruht auf dem Prinzip der FRESSENIUS-CLASSENSchen Kohlensäurebestimmung. Der dazu verwendete Apparat zeigt verschiedene Vereinfachungen. Die Füllung mit Natronasbest und Phosphorperoxyd verursacht eine bedeutende Verkleinerung des Absorptionsrohres, wodurch eine größere Wägenauigkeit erzielt wird. Die Methode, die auch bei Anwesenheit von Sulfiden angewendet werden kann, zeigt neben dem Vorteil schneller Durchführbarkeit die gleiche Genauigkeit wie die Makrobestimmung. Bezüglich der näheren Ausführungen und Einzelheiten der Apparatur sei auf das Original verwiesen.

f) Bestimmung der Alkalität der Asche. Unter der „Alkalität der Asche“ versteht man die ccm N.-Alkalilauge, die der Gesamtmenge der alkalisch reagierenden Stoffe der Asche äquivalent sind bzw. die ccm N.-Säure, die zur Neutralisation der Asche bzw. der darin vorhandenen Carbonate und Oxyde erforderlich sind.

Als „Alkalitätszahl“ bezeichnet man die ccm N.-Säure, die zur Neutralisation von 1 g Asche erforderlich sind<sup>2</sup>.

Man kann diese Werte aus der Gesamtanalyse der Aschenbestandteile berechnen. Da diese Art der Bestimmung aber sehr langwierig ist, bedient man sich in der Praxis der weit einfacheren direkten Bestimmung der Alkalität.

Ursprünglich bestimmte man die Alkalität der Asche nach dem Vorschlage von E. SPAETH<sup>3</sup> einfach in der Weise, daß man zu der Asche von 10—20 g Substanz 5 ccm N.-Schwefelsäure setzte, die Masse mit heißem Wasser in ein Becherglas spülte, 5—10 Minuten schwach erhitzte und die nicht verbrauchte Säure zurücktitrierte, wobei E. SPAETH vermutlich — Angaben darüber fehlen — Lackmus als Indicator diente. Bei späteren Versuchen hat man Phenolphthalein als Indicator gewählt.

Bei Fruchtsäften, bei denen E. SPAETH die Bestimmung der Aschenalkalität zuerst anwendete, wird diese bedingt durch den Gehalt an Carbonaten und Oxyden. Bei Aschen, welche größere Mengen von Phosphaten enthalten, wirken diese mit auf ihre Alkalität ein. Da diese aber in den meisten Fällen bestimmt wird, um lediglich die durch Carbonate und Oxyde bedingte Alkalität zu erfassen, hat K. FARNSTEINER<sup>4</sup> ein Verfahren ausgearbeitet, bei dem die Einwirkung der Phosphate ausgeschaltet wird. Er bezeichnet die so gewonnenen Werte als die wahre Alkalität der Aschen und versteht darunter den nach normaler Bindung der Basen durch die Mineralsäuren (ausschließlich Kieselsäure) für die Kohlensäure verfügbar bleibenden Rest der Basen.

In diesem Sinne sind — zum Teil im Widerspruch mit ihrer Wirkung auf die Indicatoren — z. B. als neutral zu betrachten:  $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ , als alkalisch:  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  usw. und schließlich als sauer:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KPO}_3$ , von denen aber die beiden ersteren in Aschen nicht vorkommen. Infolge eines hohen Gehaltes an Phosphor in Lebensmitteln (z. B. Mehl und Brot) können deren Aschen infolge Gehaltes an Metaphosphat eine sog. negative Alkalität aufweisen.

<sup>1</sup> W. REICH-ROHRWIG: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, **95**, 315.

<sup>2</sup> P. BUTTENBERG: Z. 1905, **9**, 141. <sup>3</sup> E. SPAETH: Z. 1901, **4**, 141.

<sup>4</sup> K. FARNSTEINER: Z. 1907, **13**, 305.



Damit bei der Bestimmung der Alkalität der Aschen der gesuchte Wert für die durch Carbonate und Oxyde hervorgerufene Alkalität gefunden und die Wirkung der Phosphate in der Asche ausgeschaltet wird, haben außer K. FARNSTEINER auch J. TILLMANS und A. BOHRMANN<sup>1</sup> eine Methode zur Bestimmung der Aschenalkalität beschrieben.

Demgegenüber haben TH. v. FELLEBERG<sup>2</sup> sowie E. VOGT<sup>3</sup> und B. PFYL<sup>4</sup> Verfahren zur Bestimmung der Alkalität von unter Zusatz von Natriumcarbonat hergestellten Aschen angegeben, die naturgemäß, namentlich bei Lebensmitteln mit hohem Phosphor- und Schwefelgehalt, abweichende Werte ergeben.

B. PFYL bezeichnet die so gefundene Alkalität als eigentliche Alkalität und definiert diese als den in Millival ausgedrückten Überschuß der Kationen Na', K', Ca'', Mg'', der nach normaler Bindung der vorhandenen Anionen PO<sub>4</sub>'', SO<sub>4</sub>'', Cl' für O'' und die Anionen der schwachen Säuren CO<sub>3</sub>'', SiO<sub>3</sub>'', BO<sub>3</sub>'', MnO<sub>3</sub>'', MnO<sub>4</sub>'', AlO<sub>2</sub>' übrig bleibt. Wenn ein solcher Überschuß nicht vorhanden ist, so ist die umgekehrte Differenz als eigentliche Acidität zu bezeichnen. Er bezieht die Alkalitäts- und Aciditätswerte nicht auf die Asche, sondern auf 100 g Lebensmittel-Trockensubstanz.

Die so gefundene Alkalität stellt also nicht die Alkalität der Asche dar, sondern die Alkalität der Mineralstoffe des Lebensmittels.

Bei der Herstellung der Aschen, welche für Alkalitätsbestimmungen dienen sollen, ist zu beachten, daß bei der sonst üblichen Veraschung mittels der Gasflamme durch die Schweflige Säure bzw. Schwefelsäure der Verbrennungsprodukte des Leuchtgases eine teilweise Neutralisierung der Asche bewirkt werden kann. Um eine derartige Wirkung zu vermeiden, führt man die Veraschung am zweckmäßigsten in einem elektrisch geheizten Muffelofen oder mittels eines Spiritusbrenners aus. Stehen beide nicht zur Verfügung, so hält man die Verbrennungsgase des Leuchtgases am besten dadurch von der Asche ab, daß die Platinschale in ein passendes rundes Loch einer größeren Asbestplatte möglichst dicht eingesetzt wird.

α) Verfahren nach K. FARNSTEINER<sup>5</sup>. Man stellt zunächst fest, ob eine kohlen säurehaltige Asche vorliegt oder nicht. Im ersteren Falle verfährt man in folgender Weise: 0,2—0,3 g der scharf getrockneten Asche löst man bei gelinder Erwärmung im bedeckten Gefäß in 10—20 ccm 0,5 N.-Salzsäure, bringt die Lösung verlustlos in einen ERLÉNMEYER-Kolben von etwa 100 ccm, erhitzt zum Sieden und hält darin bei kleinstmöglicher Flamme unter häufigem Umschwenken 3—5 Minuten. Nach dem Abkühlen bringt man die Flüssigkeit in einen 100 ccm-Meßzylinder mit Glasstopfen, in dem sich 5—10 ccm einer neutralen Calciumchlorid-Ammoniumchloridlösung (5 g Calciumchlorid + 10 g Ammoniumchlorid mit Wasser zu 100 ccm gelöst) und 10—20 ccm genau eingestellter 0,5 N.-Ammoniaklösung befinden. Man füllt mit Wasser bis zur Marke auf, schüttelt kräftig durch, pipettiert nach dem Stehen über Nacht von der klaren Flüssigkeit 25—50 ccm ab und titriert unter Zugabe von Methylorange mit 0,5 N.-Salzsäure zurück.

Berechnung. Ist

$a$  = Gewicht der angewendeten Asche,

$S$  = Volumen der zur Lösung angewendeten ccm N.-Säure,

$n$  = Volumen des zugesetzten Ammoniaks in ccm N.-Ammoniak,

$s$  = Volumen der zum Zurücktiteren verbrauchten, auf die ganze Substanzmenge berechneten Säure in ccm N.-Säure, so ist die Alkalität für  $a$  g Asche =  $S + s - n$ .

<sup>1</sup> J. TILLMANS u. A. BOHRMANN: Z. 1921, 41, 1.

<sup>2</sup> TH. v. FELLEBERG: Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene 1916, 7, 81.

<sup>3</sup> E. VOGT: Z. 1921, 42, 145.

<sup>4</sup> B. PFYL: Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1914, 47, 1; Z. 1922, 43, 313.

<sup>5</sup> K. FARNSTEINER: Z. 1907, 13, 305.

In Aschen mit kaum sichtbarer Kohlensäureentwicklung können Pyrophosphate enthalten sein, die man durch Erhitzen der Asche mit der 0,5 N.-Salzsäure 1 Stunde lang im schwachen Sieden in Orthophosphate überführt. Die abgekühlte Lösung wird dann wie oben weiter behandelt.

β) Verfahren nach J. TILLMANS und A. BOHRMANN<sup>1</sup>. αα) Das für sämtliche Aschen geeignete Verfahren beruht darauf, daß man durch Vermeidung jeglichen Erwärmens die Hydrolyse der Pyro- und Metaphosphate verhindert und diese vor der Rücktitration durch Zusatz von Calciumchlorid zur Abscheidung bringt. Die Ausführung der Bestimmung geschieht in folgender Weise:

10 g der Substanz werden in einer Platinschale verascht und die Asche auf das feinste gepulvert; die Asche darf keinerlei Körnchen oder Stückchen mehr enthalten. Darauf versetzt man die Asche mit mindestens 50 ccm 0,1 N.-Salzsäure und spült in ein Becherglas über. Geht die Lösung der Asche nicht schnell genug vor sich, so wird noch weiter Säure zugesetzt, unter Umständen bis zu 100 ccm. Auch ist nochmals zu kontrollieren, ob die Asche keine Stückchen mehr enthält. Gegebenenfalls sind diese noch nachträglich mit einem Glaspistill zu zerdrücken. Darauf läßt man längstens  $\frac{1}{4}$  Stunde in der Kälte stehen, gibt einige Löffel voll fein gepulvertes chemisch reines Natriumchlorid hinzu und schüttelt den Inhalt des Becherglases zur Vertreibung der Kohlensäure kräftig um. Unter immer wiederholtem Umschütteln setzt man weiter so viel Natriumchlorid hinzu, bis die Lösung daran gesättigt ist. Die über der Flüssigkeit lagernde Kohlensäure wird zweckmäßig mittels eines kleinen Gummigebläses entfernt. Darauf werden 30 ccm einer 40%igen Calciumchloridlösung sowie 0,2 ccm Phenolphthaleinlösung (1%) zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf 14° wird mit 0,1 N.-Natronlauge auf deutliche Rötung titriert. Man läßt die Flüssigkeit im verschlossenen Meßkölbchen 2 Stunden bei 14° stehen und, falls nach dieser Zeit Entfärbung eingetreten sein sollte, titriert man nochmals bis zur Rötung weiter. Die Differenz zwischen Säure- und Laugeverbrauch gibt sofort die (Carbonat- und Oxyd-)Alkalität an.

ββ) Verfahren für Aschen, die Carbonate und Oxyde enthalten. Solche Aschen können keine störenden Pyro- und Metaphosphate enthalten; die saure Lösung darf daher erhitzt werden.

Die Asche wird in üblicher Weise mit überschüssiger titrierter Salzsäure übergossen, in ein Becherglas umgespült und zur Vertreibung der Kohlensäure gekocht. Der einzige Unterschied gegenüber der Alkalitätsbestimmung nach E. SPAETH (S. 1215) besteht nur darin, daß vor der Rücktitration mit Phenolphthalein 30 ccm 40%ige neutrale Calciumchloridlösung zugesetzt werden. Der Unterschied zwischen Säure- und Laugeverbrauch gibt ohne weiteres und mit größerer Genauigkeit als das FARNSTEINERSche Verfahren die richtige Alkalität an.

γγ) Trennung von Carbonat- und Oxydalkalität. Die Asche mancher Lebensmittel enthält neben Carbonaten auch Magnesiumoxyd. Bei dem üblichen Behandeln der Aschen mit Ammoniumcarbonat (S. 1209) gelingt es nicht, das Magnesiumoxyd wieder in Carbonat zu verwandeln, da Magnesiumcarbonat äußerst leicht seine Kohlensäure abgibt. Zur Trennung der Carbonat- und Oxydalkalität bestimmt man die Gesamtalkalität nach ββ) und außerdem die Kohlensäure. Die Bestimmung kann nach den Verfahren auf S. 1211 geschehen oder volumetrisch mit Hilfe des für die Backpulveruntersuchung von J. TILLMANS und O. HÄUBLEIN<sup>2</sup> angegebenen Apparates. Da das Verhältnis zwischen Carbonaten und Oxyden bei derselben Substanz aber je nach der Art der Veraschung wechseln kann, bietet die Trennung der Carbonat- und Oxydalkalität kein besonderes Interesse.

<sup>1</sup> J. TILLMANS u. A. BOHRMANN: Z. 1921, 41, 1.

<sup>2</sup> J. TILLMANS u. O. HÄUBLEIN: Z. 1917, 34, 353.

γ) Verfahren nach E. VOGT<sup>1</sup> und B. PFYL<sup>2</sup>. Bei diesen Verfahren wird zur gleichzeitigen Erfassung der gesamten in den Lebensmitteln vorhandenen anorganischen Säuren und der gesamten bei der Veraschung aus organischen Schwefel- und Phosphorverbindungen entstehenden Schwefel- und Phosphorsäuren die Veraschung unter Zusatz von Natriumcarbonat (S. 1220) vorgenommen und die zugesetzte Menge bei der Berechnung der Alkalitätswerte wieder in Abzug gebracht. Die nach diesem Verfahren gefundenen Alkalitätswerte sollen nach PFYL gleichmäßiger und zuverlässiger ausfallen als bei der Veraschung ohne Natriumcarbonatzusatz.

Die Ausführung der Bestimmung nach VOGT und PFYL ist im wesentlichen die gleiche. Nach VOGT verfährt man, wie folgt:

10 g der fein gepulverten Substanz werden mit 20 ccm 0,1 N.-Natriumcarbonatlösung gut durchfeuchtet und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, dann vorsichtig unter Schutz vor den Flammgasen (S. 1216) verascht, die genügend verkohlte Substanz in der Schale mit einem Achatpistill zerdrückt, darauf die verkohlte Masse einige Male mit kleinen Mengen heißem Wasser ausgezogen und die rückständige Kohle nebst Filter vollständig verascht. Man gibt dann das Filtrat zur Asche, engt, wenn die Flüssigkeitsmenge zu groß ist, auf 20—25 ccm ein, säuert mit einer gemessenen Menge eingestellter etwa 0,1 N.-Salzsäure an und fügt einige Tropfen reine Wasserstoffsuperoxydlösung (30%) hinzu.

Die Aschenlösung wird dann 15 Minuten unter Bedeckung der Platinschale mit einem Uhrglase auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Lösung in eine weiße Porzellanschale filtriert und mit einem Tropfen Methylorange (0,1%) versetzt. Darauf wird mit 0,1 N.-Natronlauge bis zur reinen Gelbfärbung titriert und mit 0,1 N.-Salzsäure bis zur eben beginnenden Rotfärbung zurücktitriert. Von den zur Lösung der Asche und zur Rücktitration insgesamt verbrauchten Säuremengen sind die Äquivalente der vor der Veraschung zugesetzten Natriumcarbonatlösung und der zur Titration verbrauchten Lauge abzuziehen. Der Rest der Säure, ausgedrückt in ccm N.-Säure und berechnet auf 100 g Trockenmasse, ergibt die „Alkalität gegen Methylorange“.

Für die nun folgende Titration der Phosphorsäure wird die auf Methylorangeumschlag titrierte Lösung der Asche mit einigen ccm verd. Salzsäure versetzt und auf ein Volumen von 10—15 ccm eingedampft. Vermutet man in der Asche größere Mengen Kieselsäure (z. B. bei kleinenreichen Cerealienmehlen), so dampft man mehrfach mit konz. Salzsäure zur Trockne, nimmt den Trockenrückstand mit konz. Salzsäure auf und löst mit wenig heißem Wasser. Die Lösung wird quantitativ in ein Kölbchen von Jenaer Glas gespült und nochmals sehr genau gegen Methylorange neutralisiert. Darauf gibt man 30 ccm neutrale 40%ige Calciumchloridlösung hinzu, kocht kurz auf, kühlt auf 14° ab, versetzt mit 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung (0,1%) und titriert mit 0,1 N.-Natronlauge bis zur deutlichen Rotfärbung. Das festverschlossene Kölbchen wird für 2 Stunden in Wasser von 40° gestellt, währenddessen die Rotfärbung meist verschwindet. Nach Ablauf dieser Zeit titriert man nach. Die hierbei vom Neutralpunkt gegen Methylorange ab insgesamt verbrauchte Menge Lauge wird in ccm N.-Lauge und auf 100 g Trockenmasse umgerechnet. Zieht man diese Zahlen, aus denen sich durch Multiplikation 0,0475 die Millimole  $PO_4'''$  ergeben, von der „Alkalität

<sup>1</sup> E. VOGT: Z. 1921, 42, 171.

<sup>2</sup> B. PFYL: Z. 1922, 43, 313. — PFYL hat das Verfahren eingehend begründet und namentlich auch den Einfluß der nur in geringer Menge und zum Teil auch nur gelegentlich in Lebensmitteln vorkommenden Elemente Blei, Zinn, Kupfer, Zink, Eisen, Aluminium und Mangan sowie der Kieselsäure und Borsäure beleuchtet. Da diese Verbindungen wegen ihrer geringen Menge auf die Alkalitätswerte praktisch ohne Einfluß sind, wird wegen ihres Einflusses auf die Originalarbeit verwiesen.

gegen Methylorange“ ab, so erhält man die „eigentliche Alkalität der Asche“ der untersuchten Probe.

Beispiel. Untersuchung von Brot: Angewendet 10 g Brot-Trockensubstanz.

Vor der Veraschung zugesetzt. . . 20,0 ccm 0,1 N.-Natriumcarbonatlösung  
 Zur Lösung der Asche verwendet . . . 40,0 ccm 0,1 N.-Salzsäure  
 Zur Titration verbraucht . . . . 12,5 ccm 0,1 N.-Natronlauge  
 Zur Rücktitration verbraucht . . . 0,3 ccm 0,1 N.-Salzsäure

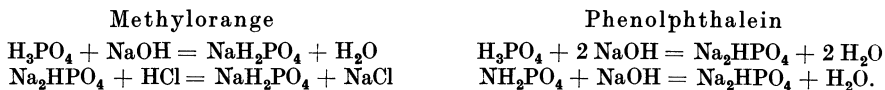
Zur Neutralisation der Asche gegen Methylorange also insgesamt verbraucht

$$40,0 + 0,3 - (20,0 + 12,5) = 7,8 \text{ ccm } 0,1 \text{ N.-Salzsäure.}$$

Zur Titration der Phosphorsäure verbraucht 20,8 ccm 0,1 N.-Natronlauge. Daraus ergibt sich  $7,8 - 20,8 = -13,0$  ccm 0,1 N.-Natronlauge oder für 100 g Brottrockensubstanz eine „eigentliche Alkalität“ von  $-13,0$  ccm N.-Natronlauge.

g) Bestimmung der Ortho-, Pyro- und Metaphosphate der Asche. Das Verfahren von J. TILLMANS und A. BOHRMANN<sup>1</sup> beruht auf den verschiedenen Umschlagspunkten von Phenolphthalein ( $1 \times 10^{-8}$ ) und Methylorange ( $1 \times 10^{-4}$ ).

Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen der tertiären Alkaliphosphate ist  $1 \times 10^{-10}$  bis  $1 \times 10^{-11}$  (sie wirken daher stark alkalisch gegen Phenolphthalein), die der sekundären Alkaliphosphate  $1 \times 10^{-8}$  bis  $1 \times 10^{-9}$  (= Umschlagspunkt des Phenolphthaleins) und die der primären Alkaliphosphate  $1 \times 10^{-4}$  (Umschlagspunkt des Methyloranges). Infolgedessen kann man mit Methylorange alle löslichen Phosphate bis zum primären und mit Phenolphthalein bis zum sekundären Salz titrieren im Sinne der Gleichungen:



Die tertiären und sekundären Erdalkaliphosphate sind in Wasser unlöslich bzw. sehr schwer löslich; sie wirken daher nicht bzw. nicht merklich auf die Indicatoren; sie werden mit Natriumoxalat aus der Lösung abgeschieden.

Ausführung der Bestimmung. Zunächst bestimmt man die Alkalität der Asche in der S. 1217 unter  $\beta$ ),  $\alpha$ ) beschriebenen Weise und erhalte damit den Säureverbrauch  $a$ . Dann wird ein weiterer Teil der Asche (mindestens 0,2 g) mit 100 ccm 0,1 N.-Salzsäure in ein Jenaer Becherglas gebracht und unter Bedeckung mit einem Uhrglase bei mäßiger Flamme 1 Stunde lang gekocht. Die Lösung wird nach dem Abkühlen filtriert, 1 Tropfen Methylorange-lösung (0,1%) zugefügt und mit 0,1 N.-Natronlauge auf Gelbfärbung titriert (Säureverbrauch  $b$ ). Dann werden 10—20 ccm gesättigter Natriumoxalat-lösung<sup>2</sup> und 0,2 ccm Phenolphthalein-lösung (0,5 g in 100 ccm Alkohol) zugegeben, und darauf wird weiter bis zur schwachen Rötung titriert (Säureverbrauch  $c$ ). Der Laugeverbrauch vom Methylorange- bis zum Phenolphthaleinumschlag sei  $d$ .

Berechnung. Bezeichnet man — alle Werte in ccm 0,1 N.-Salzsäure ausgedrückt — die Menge der für Orthophosphate verbrauchten Säure mit  $x$ , die für Pyrophosphate mit  $y$  und die für Metaphosphate mit  $z$ , so ergeben sich folgende Beziehungen:

$\alpha$ ) Ist  $a$  positiv, ist also Alkalität vorhanden, so können nur Orthophosphate vorhanden sein,  $y$  und  $z$  sind dann = 0 und es ist

$$x = 2/3 (b - a).$$

Zur Umrechnung von  $x$  in mg  $\text{PO}_4$  multipliziert man  $x$  mit dem Faktor 3,167 und berechnet daraus unter Berücksichtigung der angewendeten Aschemenge die Orthophosphat-Prozente.

<sup>1</sup> J. TILLMANS u. A. BOHRMANN: Z. 1921, 41, 1.

<sup>2</sup> Da bei größeren Calciumoxalatniederschlägen durch Phenolphthaleinabsorption zu früh eine Rötung vorgetäuscht wird, ist es ratsam, nach erfolgtem Methylorangeumschlag erst die Lösung wieder zum Sieden zu bringen, das Natriumoxalat tropfenweise in der Hitze zuzugeben, abzufiltrieren und dann erst die erkaltete Lösung weiter zu titrieren.

β) Ist  $a = 0$  oder negativ und  $c$  positiv, so ergibt sich  

$$x = 3c \quad \text{und} \quad y = 2(b - 2c)$$

und man berechnet aus  $x$  die mg Orthophosphat- $\text{PO}_4$  wie bei  $\alpha$ ) durch Multiplikation mit dem Faktor 3,167 und aus  $y$  die mg Pyrophosphat- $\text{PO}_4$  durch Multiplikation mit dem Faktor 4,75 und daraus die Ortho- und Pyrophosphatprozentage.

γ) Ist  $a = 0$  oder negativ und auch  $c$  negativ, so liegen nur Pyro- und Metaphosphate vor und es ergibt sich

$$y = 2b \quad \text{und} \quad z = -c$$

und man berechnet  $y$  wie bei β) und  $z$  durch Multiplikation mit dem Faktor 9,5 auf mg Metaphosphat- $\text{PO}_4$  und diese auf Metaphosphatprozentage.

δ) Den Gesamtphosphatgehalt berechnet man durch Multiplikation von  $d$  mit dem Faktor 9,5 auf mg Gesamt-Phosphat- $\text{PO}_4$  und diese auf Prozente.

Beispiele. Auf diese Weise wurden folgende Werte berechnet:

| Asche von                  | Carbonat-<br>und Oxyd-<br>alkalität | % -Gehalt der Asche an<br>Phosphation als |                   |                   |
|----------------------------|-------------------------------------|---|-------------------|-------------------|
|                            |                                     | Ortho-<br>phosphat                        | Pyro-<br>phosphat | Meta-<br>phosphat |
| Vollmilch . . . . .        | 0,4                                 | 30—40                                     | 0                 | 0                 |
| Rindfleisch . . . . .      | — 0,4                               | 6,2                                       | 47,2              | 0                 |
| Himbeersaft . . . . .      | 7,6                                 | 14,9                                      | 0                 | 0                 |
| Weizenmehl (94%) . . . . . | — 0,8                               | —   | 57,8              | 4,2               |
| Roggenmehl (94%) . . . . . | — 0,7                               | 5,0                                       | 49,0              | 0                 |
| Kartoffelwalmehl . . . . . | 4,5                                 | 13,4                                      | 0                 | 0                 |
| Kartoffelstärke . . . . .  | 0                                   | 0   | 32,8              | 3,7               |
| Kakao . . . . .            | 2,8                                 | 33,2                                      | 0                 | 0                 |

## 2. Veraschung mit alkalischen Zusätzen.

Beim Veraschen ohne alkalische Zusätze erhält man in der Asche von Lebensmitteln, welche reich an Phosphor- und Schwefelverbindungen sind, nicht die Gesamtmenge an Phosphor und Schwefel, sondern es tritt bei der Veraschung infolge Mangels an Kationen ein Verlust an Phosphor und Schwefel — unter Umständen auch ein solcher von Chlor — ein.

Handelt es sich also darum, die Gesamtmenge dieser Elemente zu erfassen, so muß die Veraschung unter alkalischen Zusätzen bzw. unter Zusatz von Verbindungen erfolgen, welche bei der Veraschung alkalische Verbindungen liefern.

Als alkalische bzw. alkalisch wirkende Zusätze bei der Veraschung kommen vorwiegend folgende zur Anwendung:

a) **Zusatz von Magnesiumacetat nach J. GROSSFELD<sup>1</sup>.** Magnesiumacetat zeichnet sich vor allen anderen vorgeschlagenen Zusatzmitteln dadurch aus, daß es eine Asche liefert, die bei Zusatz von verd. Säuren nur wenig aufbraust, wodurch Verluste vermieden werden, und ferner eine sich leicht weiß brennende lockere Asche liefert. Man verfährt, wie folgt: 5 g der trockenen, feingepulverten Substanz werden in einer Platinschale mit 20 ccm Magnesiumacetatlösung (50 g reines Magnesiumoxyd werden in überschüssiger Essigsäure gelöst und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und filtriert) vermischt und der Schaleninhalt zunächst auf dem Wasserbade und dann im Trockenschranke bei 100—120° völlig getrocknet und darauf in der üblichen Weise verascht. Die Veraschung geht meistens sehr glatt vor sich und eine Auslaugung der Asche mit Wasser ist in der Regel überflüssig. In der Asche werden die Phosphorsäure nach S. 1257 und die Schwefelsäure nach S. 1251 bestimmt.

B. TOLLENS und SCHÜTTELWORTH<sup>2</sup> haben in ähnlicher Weise den Zusatz von Calciumacetat empfohlen.

<sup>1</sup> J. GROSSFELD: Chem.-Ztg. 1920, 44, 285.

<sup>2</sup> B. TOLLENS u. SCHÜTTELWORTH: Journ. Landw. 1899, 47, 199.

b) **Zusatz von Natriumcarbonat.** Dieser zuerst und auch heute noch vielfach angewendete Zusatz (S. 1218) hat den Nachteil, daß die Asche dabei leicht zusammenschmilzt und infolgedessen die Kohle schlecht verbrennt. Man durchfeuchtet die zu veraschende Substanz in einer Platinschale mit der Lösung von chemisch reinem Natriumcarbonat (50 g wasserfreies Natriumcarbonat im l enthaltend) unter Zusatz von etwas reiner Natronlauge, trocknet vollständig im Wasserbade und verascht. Nachdem die Masse verkohlt ist, zerdrückt man sie in der Platinschale mit einem Pistill, durchfeuchtet sie mit chemisch reinem Wasserstoffsperoxyd, unter Abspülen des Pistills mit Wasser, trocknet auf dem Wasserbade ein, verbrennt weiter und wiederholt dieses nötigenfalls noch ein oder mehrere Male.

c) **Sonstige Zusätze.** An solchen sind noch empfohlen worden: Von H. WISLIGENUS<sup>1</sup> neben Calciumacetat auch noch ein solcher von Kalkmilch, von B. W. HOWK und E. E. DE TURK<sup>2</sup> eine Vermischung der Substanz mit Calciumcarbonat und von anderer Seite Bariumhydroxyd.

### 3. Aufschließung mit Säuren.

Um einen Verlust an Mineralstoffen, welche bei der Veraschung sich mehr oder weniger verflüchtigen können (Arsen, Antimon, Quecksilber, Zink, Phosphor usw.) zu verhüten, empfiehlt es sich in vielen Fällen, von der Veraschung ganz abzusehen und die Lebensmittel usw. durch Erhitzung mit oxydierenden Säuregemischen zu verbrennen.

Hiervon wird insbesondere bei der Ausmittlung vieler Metallgifte Gebrauch gemacht (S. 1380—1420), wo man die Substanzen mit Salzsäure und Kaliumchlorat, Salzsäure und Chlorsäure, Salpetersäure und Kaliumpermanganat, konz. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure, Kaliumpercarbonat und CAROSCHER Säure (Oxyschwefelsäure, H<sub>2</sub>SO<sub>5</sub>) usw. aufschließt.

Bei Lebensmitteluntersuchungen schließt man geringere Substanzmengen zweckmäßig nach dem Verfahren von A. NEUMANN und E. WÖRNER, größere Mengen nach dem von R. BERG auf.

a) Verfahren von A. NEUMANN<sup>3</sup> und E. WÖRNER<sup>4</sup>. Die Substanz wird mit einem Gemisch von gleichen Teilen konz. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure ( $d = 1,4$ ) aufgeschlossen; auf 5 g Substanz sind etwa 10 ccm dieses Säuregemisches erforderlich.

Die Substanz wird in einem Rundkolben mit der abgemessenen Menge des Säuregemisches übergossen und kalt stehengelassen, bis die Hauptreaktion beendet ist; darauf erst wird mit kleiner, später mit stärkerer Flamme erhitzt. Sobald die Entwicklung der braunen nitrosen Dämpfe geringer wird, gibt man aus einem Hahntrichter tropfenweise weiteres Gemisch (annähernd gemessene Mengen) hinzu und fährt damit fort, bis ein Nachlassen der Reaktion eintritt und die Stärke der braunen Dämpfe abgeschwächt erscheint. Um zu entscheiden, ob die Substanzerstörung beendet ist, unterbricht man das Hinzufließen des Gemisches für kurze Zeit, erhitzt aber weiter, bis die braunen Dämpfe verschwunden sind, und beobachtet, ob sich die Flüssigkeit im Kolben dunkler färbt oder gar noch schwärzt. Ist dieses der Fall, so läßt man wieder Säuregemisch zufließen und wiederholt nach einigen Minuten die obige Probe. Wenn nach dem Abstellen des Gemisches und dem Verjagen der braunen Dämpfe die hellgelbe oder farblose Flüssigkeit sich bei weiterem Erhitzen nicht mehr dunkler färbt und sich auch keine Gasentwicklung mehr zeigt, ist die Verbrennung

<sup>1</sup> H. WISLIGENUS: Zeitschr. analyt. Chem. 1901, 40, 441.

<sup>2</sup> B. W. HOWK u. E. E. DE TURK: Ind. Engin. Chem. Analytical Edition 1932, 4, 111; Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 95, 299.

<sup>3</sup> A. NEUMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1902, 37, 116; 1904, 43, 35.

<sup>4</sup> E. WÖRNER: Z. 1908, 15, 732.

beendet. Ist die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt, so wird sie beim Erkalten meist völlig wasserhell. Nun fügt man dreimal so viel Wasser hinzu, wie Säuregemisch verbraucht wurde, erhitzt und kocht etwa 5—10 Minuten. Dabei entweichen braune Dämpfe, welche von der Zersetzung der entstandenen Nitrosylschwefelsäure herrühren.

Bei fettreichen Substanzen oder auch bei Fetten selbst empfiehlt es sich nach A. BÄURLE, W. RIEDEL und K. TÄUFEL<sup>1</sup> nicht, das Säuregemisch zuzusetzen, sondern zunächst die Schwefelsäure einwirken zu lassen, dann erst die Salpetersäure in kleinen Anteilen zuzusetzen. Auf diese Weise wird das lästige Schäumen weitgehend beseitigt. Nach jedem Zusatz von Salpetersäure muß man so lange erhitzen, bis sich die Masse gerade wieder schwärzt. Dann erfolgt wieder Zugabe von Salpetersäure, bis die abgeschiedene Kohle oxydiert ist. Erhitzt man zu hoch, so tritt starke Verkohlung ein, und die abgeschiedene Kohle setzt ihrer Oxydation sehr große Schwierigkeiten entgegen. Will man Fette veraschen, so darf man erst am Schluß mit voller Flamme erhitzen; Zugabe von etwas Perhydrol kann zuweilen sehr wertvoll sein.

b) Verfahren von R. BERG<sup>2</sup>. 200—250 g gereinigte frische Substanz werden in einem 2 l-Bechergläse mit 500—700 ccm reiner höchstkonzentrierter Salpetersäure übergossen, durchgerührt und mit einem Uhrgläse bedeckt. Als bald gerät die ganze Masse ins Kochen, wobei massenhaft nitrose Gase entweichen. Man läßt am besten bis zum nächsten Tage stehen; dann ist alles bis auf die groben Cellulosegebilde gelöst. Die Lösung wird darauf nach und nach in einem KJELDAHL-Kolben, in den man 50 ccm konz. Schwefelsäure gegeben hat, eingekocht, bis alle Salpetersäure verdampft ist. Gewöhnlich erzielt man auf diese Weise sofort eine wasserklare Lösung der Mineralstoffe in der heißen konz. Schwefelsäure. Sollte die Lösung noch braun oder sogar schwarz sein, so gibt man tropfenweise konz. Salpetersäure hinzu, kocht wieder bis zum Auftreten der weißen Schwefelsäurenebel und wiederholt diese Behandlung so lange, bis die Schwefelsäurelösung farblos oder höchstens durch Eisenverbindungen schwach grüngelb bleibt. Nach dem Abkühlen fügt man 3 Volumen Wasser hinzu, kocht, bis die Nitrosylschwefelsäure vollständig zersetzt ist, führt die Lösung in eine Platinschale über, verdunstet sie zunächst auf dem Wasserbade, erhitzt dann über dem Pilzbrenner, bis die Schwefelsäure verjagt ist und die sauren Sulfate zum größten Teil zerlegt worden sind; Glühen ist nicht statthaft. Nach dem Erkalten löst man unter Erwärmen in Salzsäure, verdampft wieder zur Staubtrockne und übergießt mit etwas konz. Salzsäure. Nach  $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen löst man den Rückstand in heißem Wasser; ist viel Calciumsulfat vorhanden, so muß die stark mit Salzsäure angesäuerte Lösung längere Zeit gekocht werden. Die Flüssigkeit wird von der Kieselsäure und etwaigem Sand abfiltriert und nach dem Erkalten auf 250 ccm aufgefüllt. Hiervon dienen 50 ccm zur Phosphorsäurebestimmung, 50 ccm zur Bestimmung der Alkalien und der Rest zur Bestimmung von Eisen, Aluminium, Mangan, Calcium und Magnesium. Verfasser gibt einen Analysengang zur Bestimmung dieser Bestandteile an.

Bei fettreichen Substanzen werden 200—250 g Substanz in einem 2 l-KJELDAHL-Kolben mit 250 ccm konz. Schwefelsäure übergossen und nach dem Zergehen der Substanz erwärmt, bis alles Wasser verjagt ist, d. h. bis die Masse unter Entwicklung von Schwefelsäurenebeln kleinblasig und schwarz geworden ist und zu schäumen beginnt. — Bei reinen Fetten ist dieses Erhitzen unnötig. — Jetzt entfernt man die Flamme und läßt aus einer Bürette in den mit einem abgesprengten Trichter bedeckten Kolben vorsichtig tropfenweise zwischen Trichter und Kolbenwand konz. Salpetersäure hinzufießen. Bei dieser Behandlung entsteht gewöhnlich ein harziger Kuchen, den man wiederholt mit einem Glasstabe verteilt. Gleichzeitig gibt man noch 100 ccm konz. Schwefelsäure hinzu. Jetzt kann man erwärmen, anfangs vorsichtig, später stärker; dabei läßt man die Salpetersäure etwas rascher zufließen und reguliert die Flamme so, daß gleichzeitig nitrose Dämpfe und Schwefel-

<sup>1</sup> A. BÄURLE, W. RIEDEL u. K. TÄUFEL: Z. 1934, 67, 274.

<sup>2</sup> R. BERG: Chem.-Ztg. 1912, 36, 509.

säurenebel entweichen, bis die Lösung beim Konzentrieren ohne Salpetersäurezusatz bis zur Nebelbildung farblos bleibt. Darauf wird weiter wie oben verfahren.

Für 200 g fettfreies Fleisch oder Gemüse sind zusammen etwa 700—900 ccm, für 200 g Speck oder Ölsamen etwa 1500—2000 ccm Salpetersäure erforderlich. Im ersteren Falle dauert die Bestimmung etwa 8 Stunden und im letzteren 2—3 Tage.

c) Verfahren von A. JENDRASSIK und S. PAPP<sup>1</sup>. Sie verfahren bei Flüssigkeiten (Wein, Most, Fruchtsäften) ähnlich wie R. BERG, wenden aber zur Oxydation gleichzeitig Wasserstoffsuperoxyd an. Sie geben die nötigenfalls eingeeengte Flüssigkeit (Wein) nach und nach in 80 ccm Salpetersäure. Wenn die starke Gasentwicklung nachläßt, erhitzen sie solange auf freier Flamme, bis die Gasentwicklung aufhört. Dann werden 30—40 ccm Wasserstoffsuperoxyd in kleinen Anteilen hinzugegeben und dabei wird jedesmal erwärmt, bis eine nennenswerte Gasentwicklung nicht mehr beobachtet wird. Nachdem das Reaktionsgemisch fast ganz eingeeengt ist, werden 5 ccm konz. Schwefelsäure zugegeben und der Rest der Salpetersäure durch Erhitzung vertrieben. Die dann noch entstehende Bräunung wird durch Zugabe von 2—3 ccm Wasserstoffsuperoxyd und weitere Erhitzung, bis Schwefelsäuredämpfe entweichen, zerstört.

## II. Bestimmung der einzelnen Mineralstoffe.

### A. Bestimmung der Basen.

Im Nachfolgenden bringen wir zunächst unter 1) einen allgemein anwendbaren Analysengang für die Trennung und Bestimmung der wichtigsten Basen der Aschen. In vielen Fällen handelt es sich aber nicht darum, alle Basen der Aschen zu bestimmen, sondern nur um die Bestimmung einzelner von ihnen; hierzu dienen die unter 2) aufgeführten Methoden zur Bestimmung der einzelnen Kationen.

#### 1. Analysengang für die Bestimmung der Kationen der Asche.

Man stellt nach dem oben (S. 1209) beschriebenen Verfahren größere Mengen Asche dar, löst sie in mäßig verdünnter Salzsäure, verdampft diese auf dem Wasserbade<sup>2</sup> und trocknet den Rückstand zur vollständigen Abscheidung der gelösten Kieselsäure bis zur vollständigen Verflüchtigung der Salzsäure. Den Rückstand löst man in verdünnter Salzsäure, filtriert<sup>3</sup> und füllt das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen, z. B. auf 300 ccm, auf.

a) Eisen und Aluminium. Die Aschen der Lebensmittel enthalten meist neben geringeren Mengen Eisenoxyd und Aluminiumoxyd größere Mengen Phosphorsäure, d. h. mehr als durch erstere gebunden werden kann. Man verfährt daher zur Bestimmung von Eisenoxyd und Aluminiumoxyd, wie folgt:

α) In einem aliquoten Teile, z. B. 100 ccm, der Aschenlösung bestimmt man den Gehalt an Eisenoxyd + Aluminiumoxyd und an Phosphorsäure diejenige Menge, die den ersteren äquivalent ist<sup>4</sup>, indem man die 100 ccm in einem geräumigen Becherglase in der Kälte mit so viel Natriumcarbonatlösung

<sup>1</sup> A. JENDRASSIK u. S. PAPP: Z. 1935, 69, 369. — Vgl. auch E. SCHULEK u. P. v. WILLETZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1928, 76, 81.

<sup>2</sup> Sollte die Aschenlösung Eisenoxydulverbindungen enthalten, was in der Regel nicht der Fall sein dürfte, so setzt man vor dem Eindampfen geringe Mengen Wasserstoffsuperoxydlösung hinzu. — Vgl. auch M. CARUS: Chem.-Ztg. 1921, 44, 1194.

<sup>3</sup> Im Filtrationsrückstände kann man nach S. 1211 den Gehalt an Sand + Ton und an löslicher Kieselsäure bestimmen.

<sup>4</sup> Ist die Menge der Phosphorsäure der Asche geringer als dem Eisenoxyd- + Aluminiumoxydgehalt äquivalent ist, so ist es natürlich die Gesamt-Phosphorsäure.



versetzt, bis eine bleibende schwache Trübung entsteht. Diese bringt man durch einige Tropfen verd. Salzsäure zum Verschwinden und fügt für je 0,1—0,2 g Eisen + Aluminium 1,5—2 g Natrium- oder Ammoniumacetat hinzu, verdünnt mit siedend heißem Wasser auf 300—400 ccm, kocht 1 Minute — durch zu langes Kochen wird der Niederschlag schleimig und schlecht filtrierbar — läßt den Niederschlag sich absetzen, filtriert sofort heiß, wäscht den Niederschlag dreimal mit heißem Wasser aus, dem man etwas Natrium- oder Ammoniumacetat zugefügt hat. — Das Filtrat muß stets deutlich sauer reagieren. — Der Niederschlag wird, weil er unter Umständen Mangan und Calciumphosphat einschließen kann, wieder in Salzsäure gelöst und die Lösung nochmals in derselben Weise behandelt<sup>1</sup>. Der nunmehr durch ein aschefreies Filter abfiltrierte und kurz ausgewaschene Niederschlag wird alsdann getrocknet, in einem Platintiegel geglüht und gewogen (*A*). Man erhält auf diese Weise die Summe von Eisenoxyd + Aluminiumoxyd + Phosphorsäure bzw. von letzterer nur denjenigen Anteil, der den ersteren beiden äquivalent ist.

β) Weitere 100 ccm der Aschenlösung dienen zur Bestimmung des Eisens. Diese kann in zweierlei Weise erfolgen: Entweder man scheidet das Eisen in der üblichen Weise aus der mit Ammoniumchlorid versetzten<sup>2</sup>, auf etwa 70° erwärmten Aschenlösung mit Ammoniak in geringem Überschuß ab und löst den abfiltrierten und ausgewaschenen Niederschlag mit warmer verdünnter Schwefelsäure auf dem Filter, oder man dampft die Aschenlösung mit einem Überschuß an Schwefelsäure auf dem Wasserbade ab. In beiden Fällen reduziert man das Eisen mit Zink zu Eisenoxydul, titriert dieses in bekannter Weise (S. 1226) mit Kaliumpermanganatlösung und berechnet seine Menge auf Eisenoxyd ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ).

γ) Der Rest (100 ccm) der Aschenlösung dient zur Bestimmung der Phosphorsäure. Die Aschenlösung wird in gleicher Weise wie bei α) behandelt, die erste Fällung mit verd. Salpetersäure gelöst und mit Ammoniummolybdat nach S. 1258 die Phosphorsäure ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) gefällt.

δ) Der Aluminiumoxydgehalt ergibt sich dann aus der Differenz:  $\text{Al}_2\text{O}_3 = A - (\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{P}_2\text{O}_5)$ .

Statt dieses indirekten Verfahrens kann man sich zur Bestimmung des Aluminiums auch der unten (S. 1228) angegebenen direkten Verfahren bedienen.

Steht nur wenig Asche zur Verfügung, so daß Eisen- und Aluminiumoxyd in derselben Lösung bestimmt werden müssen, so verfährt man zunächst wie oben unter α) und erhält damit die Summe an Eisen- und Aluminiumoxyd + Phosphorsäure (*A*). Um hieraus zunächst die Phosphorsäure zu entfernen, vermengt man den Inhalt des Platintiegels in diesem nach dem Vorschlage von TREADWELL<sup>2</sup> mit der sechsfachen Menge eines Gemisches aus 4 Tln. Natriumcarbonat und 1 Tl. Kieselsäure, schmilzt auf dem Gebläse, zieht die Schmelze mit Wasser, dem etwas Ammoniumcarbonat zugesetzt ist, aus und filtriert. Das Filtrat enthält dann alle Phosphorsäure mit wenig Kieselsäure, der Rückstand dagegen alles Eisen- und Aluminiumoxyd und den größten Teil der Kieselsäure.

1. Der Rückstand wird mit Salzsäure in einem Porzellantiegel bis zur völligen Lösung des Eisenoxyds digeriert, hierauf mit verd. Schwefelsäure versetzt, soweit wie möglich im Wasserbade verdampft und dann über freier Flamme bis zum Entweichen von Schwefelsäuredämpfen erhitzt. Nach dem Erkalten fügt man Wasser hinzu, digeriert längere Zeit im bedeckten Tiegel im Wasserbade und filtriert von der Kieselsäure ab. Das Filtrat wird mit Schwefeldioxyd oder Zink reduziert und dann das Eisen mit Permanganatlösung nach S. 1226 titriert und auf Eisenoxyd (*B*) berechnet.

2. Das Filtrat wird mit Salzsäure zur Trockne verdampft, um die Kieselsäure abzuscheiden, der Rückstand mit wenig Wasser und Salzsäure aufgenommen, filtriert, in diesem Filtrat die Phosphorsäure nach Zusatz von Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion nach

<sup>1</sup> Wenn die Aschenlösung größere Mengen Salzsäure enthält, ist natürlich ein Zusatz von Ammoniumchlorid nicht erforderlich.

<sup>2</sup> F. P. TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, 11. Aufl., Bd. II. S. 95, herausgeg. von W. D. TREADWELL. Leipzig und Wien: Franz Deuticke 1930.

S. 1261 mit Magnesiamixtur als Magnesiumammoniumphosphat gefällt und in üblicher Weise als Pyrophosphat gewogen.  $Mg_2P_2O_7 \times 0,6376 = P_2O_5$  (C).

3. Das Aluminiumoxyd ergibt sich alsdann aus der Differenz  $Al_2O_3 = A - (B + C)$ .

**b) Mangan.** Es ist in den Aschen meist nur in geringen Mengen vorhanden.

Das Filtrat der Acetatfällung nach a),  $\alpha$ ) enthält neben Mangan, den Erdalkalien und den Alkalien noch einen Teil der Phosphorsäure. Man entfernt letztere nach den unter a),  $\alpha$ ) beschriebenen Verfahren, indem man das deutlich essigsäure Filtrat zum Sieden erhitzt und tropfenweise Ferrichloridlösung hinzugibt, bis außer dem gelblichweißen Niederschlag von Ferriphosphat auch das bräunliche basische Ferriacetat ausfällt. Man filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn mit heißem ammoniumacetathaltigem Wasser aus und dampft die Lösung auf ein geringes Volumen ein. Nach TREADWELL<sup>1</sup> bestimmt man das Mangan wegen des Gehaltes der Lösung an Calcium und Magnesium am besten als Sulfid bei Gegenwart von viel Ammoniumsalz in der Kälte, wie folgt: Man versetzt die in einem 100 ccm-ERLENMEYER-Kolben befindliche Lösung mit etwa 2 g Ammoniumchlorid oder -nitrat und Ammoniak bis zur schwach alkalischen Lösung, gibt dann frisch bereitetes farbloses Ammoniumsulfid in geringem Überschuß hinzu, füllt den Kolben mit ausgekochtem kaltem Wasser und läßt den mit einem Kork verschlossenen Kolben mindestens 24 Stunden stehen. Nachdem sich der fleischrote Niederschlag gut abgesetzt hat, dekantiert man die überstehende Flüssigkeit, ohne den Niederschlag aufzurühren durch ein Filter, das man möglichst angefüllt hält, bringt schließlich den Niederschlag auf das Filter und wäscht ihn mit verd. Ammoniumsulfidwasser aus. Da der Niederschlag in der Regel durch Calcium- und Magnesiumcarbonat verunreinigt ist, löst man ihn mit Salzsäure wieder auf, kocht die Lösung zur Entfernung von Kohlensäure und wiederholt die Fällung mit Ammoniumsulfid. Der nun erhaltene Niederschlag von Mangansulfid wird getrocknet und in einem tarierten Porzellantiegel zuerst mit kleiner Flamme und dann mit einem kräftigen Teclubrenner, besser in einem elektrischen Muffelofen, auf etwa 1000° erhitzt, wodurch das Sulfid zu Mangani-manganooxyd ( $Mn_3O_4$ ) oxydiert wird.

Man kann den Mangansulfidniederschlag auch im Porzellantiegel in möglichst wenig überschüssiger Schwefelsäure lösen, die Lösung zunächst auf dem Wasserbade verdampfen, dann die Schwefelsäure im Luftbade vorsichtig abrauchen, darauf zur Rotglut — am besten im elektrischen Muffelofen auf 450—500° (nicht höher!) — erhitzen und als Mangansulfat ( $MnSO_4$ ) zur Wägung bringen.

**c) Calcium.** Es wird entweder  $\alpha$ ) im Filtrat der Acetatfällung nach a),  $\alpha$ ) (S. 1224), wenn Mangan nicht vorhanden ist, oder  $\beta$ ) im Filtrate der Mangansulfidfällung nach a als Calciumoxalat abgeschieden und als Calciumoxyd<sup>2</sup> bestimmt.

$\alpha$ ) Im Filtrate der Acetatfällung. Das nach a)  $\alpha$ ) erhaltene essigsäure<sup>3</sup> Filtrat der Acetatfällung wird zum Sieden erhitzt und das Calcium mit Ammoniumoxalatlösung in der Siedehitze gefällt. Nach zwölfstündigem Stehen wird das Calciumoxalat abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und als Calciumoxyd zur Wägung gebracht.

$\beta$ ) Im Filtrate der Mangansulfidfällung. Das nach b) erhaltene phosphorsäurefreie Filtrat von der Mangansulfidfällung wird zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, der abgeschiedene Schwefel abfiltriert und im Filtrate das Calcium als Calciumoxalat abgeschieden und als Calciumoxyd zur Wägung gebracht.

**d) Magnesium.** Im Filtrate des nach c) erhaltenen Calciumoxalatniederschlags wird, nötigenfalls nach dem Einengen der Lösung, das Magnesium nach S. 1233 als Ammonium-magnesiumphosphat oder mit 8-Oxychinolin abgeschieden.

**e) Kalium und Natrium.** Zu ihrer Bestimmung wird die salzsaure Lösung einer besonders hergestellten Asche (etwa 0,5 g) oder ein entsprechender aliquoter Teil der nach S. 1223 hergestellten salzsauren Aschenlösung mit so viel

<sup>1</sup> F. P. TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, 11. Aufl., Bd. II, S. 103, herausgeg. von W. D. TREADWELL. Leipzig und Wien: Franz Deuticke 1930.

<sup>2</sup> Das Calciumoxalat kann auch als solches nach O. BRUNCK (Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 94, 81) oder als Calciumcarbonat oder -sulfat bestimmt werden. Vgl. S. 1232.

<sup>3</sup> Die Fällung muß in essigsaurer Lösung erfolgen, weil die Lösung meist noch Phosphorsäure enthält.

Bariumchloridlösung, als zur Ausfällung der Schwefelsäure erforderlich ist, zur Entfernung des größten Teiles der freien Salzsäure auf dem Wasserbade ein, verdünnt nötigenfalls mit Wasser und setzt Kalkmilch in geringem Überschuß hinzu. Hierdurch werden alle Schwefelsäure, alle Phosphorsäure, Eisenoxyd, Manganoxydul und Magnesia gefällt. Der Niederschlag wird so lange ausgewaschen, bis das zuletzt ablaufende Waschwasser eine mit Salpetersäure angesäuerte Silberlösung nicht mehr trübt. Aus dem Filtrat fällt man das überschüssige Calcium und Barium durch mit Ammoniak versetzte Ammoniumcarbonatlösung, läßt absitzen, filtriert und wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion aus. Das Filtrat dampft man am besten in einer großen Platinschale oder, wenn diese nicht vorhanden ist, in einer gut glasierten Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Die trockene Masse wird in letzterem Falle mittels eines Platinspatels in eine kleinere Platinschale gebracht und über freier Flamme vorsichtig gegläht. Man läßt die Platinschale erkalten, spült mit heißem Wasser die noch in der Porzellanschale verbliebenen Reste in erstere hinein, verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne, glüht, fällt nochmals und, wenn nötig, noch ein drittes Mal mit Ammoniak und Ammoniumcarbonat, bis die Lösung des gelinde geglähten Rückstandes durch letztere Fällungsmittel nicht mehr getrübt wird. F. T. TREADWELL empfiehlt zur Entfernung der letzten Spuren Kalk die zweite Fällung mit Ammoniumoxalat und Ammoniak vorzunehmen, 12 Stunden stehen zu lassen und dann erst zu filtrieren. Das Filtrat bzw. die klare Flüssigkeit wird mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert, in einer ausgeglühten und gewogenen Platinschale zur Trockne verdampft, der Rückstand gelinde gegläht und als Gesamt-Alkalichloride gewogen.

In dieser Lösung wird das Kalium nach einem der auf S. 1234 angegebenen Verfahren bestimmt und das Natrium entweder auf indirektem Wege berechnet oder nach der Uranylmethode (S. 1238) bestimmt.

Zur Berechnung des Natriums auf indirektem Wege rechnet man das direkt bestimmte Kalium auf Kaliumchlorid um und zieht seine Menge von den oben gefundenen Gesamt-Alkalichloriden ab. Die Differenz stellt die Menge des vorhandenen Natriumchlorids dar, das, mit 0,5307 multipliziert, die Menge des Natriumoxyds ergibt.

## 2. Bestimmung der einzelnen Kationen.

In diesem Abschnitt werden nur die gebräuchlichsten Verfahren zur Bestimmung der namentlich in Lebensmitteln vorkommenden Kationen behandelt. Bezüglich Nachweis und Bestimmung von Kupfer und Zink sei auf den Abschnitt „Ausmittlung der Gifte“ (S. 1417—1419) verwiesen.

a) Eisen.  $\alpha$ ) Gewichtsanalytische Bestimmung durch Fällung mit Ammoniak. Die ammoniumchloridhaltige Ferrisalzlösung wird bei etwa 70° mit einem geringen Überschuße von Ammoniak versetzt. Der entstandene rotbraune Ferrihydroxyniederschlag wird abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und in einem Porzellantiegel zunächst über kleiner Flamme getrocknet und schließlich bis zur Gewichtskonstanz gegläht und als Eisenoxyd ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) zur Wägung gebracht.

Das Verfahren ist nur anwendbar, wenn außer Eisen keine anderen durch Ammoniak fällbaren Metalle (Aluminium usw.) sowie Phosphate, Oxalate usw. in der Lösung vorhanden sind. Sind solche vorhanden, so kann man das Eisen zunächst nach S. 1229 als Sulfid abscheiden, dieses abfiltrieren, in Salzsäure lösen, oxydieren und dann wie oben bestimmen.

Ist das Eisen ganz oder zum Teil in Ferroform vorhanden, so muß es zunächst durch Eindampfen mit Salpetersäure oder durch Erhitzen mit Kaliumchlorat und Salzsäure in die Ferriform übergeführt werden.

β) Maßanalytische Bestimmung mit Kaliumpermanganat. Da hierfür das Eisen in Ferroform in schwefelsaurer Lösung vorliegen muß, wird die Eisenlösung zunächst durch Eindampfen mit einem mäßigen Überschuß an Schwefelsäure von Salz- und Salpetersäure befreit, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und darauf das Ferri- zu Ferrosalz reduziert. Dies geschieht durch Reduktion mit Schwefeldioxyd oder mit Zink.

Die erkaltete Eisenlösung wird dann mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung titriert, bis die Rötung  $\frac{1}{2}$  Minute bestehen bleibt.

Zur Reduktion durch Schwefeldioxyd neutralisiert man die Ferrisalzlösung mit Natriumcarbonat, fügt überschüssige Schweflige Säure hinzu und kocht, unter gleichzeitigem Durchleiten von Kohlendioxyd, bis der Überschuß an Schwefliger Säure vollständig vertrieben ist. Es genügt nicht, sich hierbei nur auf den Geruchssinn zu verlassen. Man leitet besser das entweichende Gas durch verd. Schwefelsäure, die mit einem Tropfen 0,1 N.-Permanganatlösung gefärbt ist. Findet nach 2—3 Minuten langem Durchleiten des entweichenden Gases keine Entfärbung statt, so ist sicher das überschüssige Schwefeldioxyd vertrieben.

Zur Reduktion durch Zink versetzt man die saure Ferrisalzlösung mit Schnitzeln von chemisch reinem Zink im Ventilkolben, erwärmt gelinde im Wasserbade, bis die Flüssigkeit vollständig farblos ist. Ein herausgenommener Tropfen darf mit Kaliumrhodanidlösung keine oder eine höchst unbedeutende Rotfärbung ergeben.

Nun läßt man erkalten, verdünnt die Lösung auf 300—400 ccm mit ausgekochtem Wasser und titriert. Da das Zink oft eisenhaltig ist, ist stets ein blinder Versuch auszuführen, dessen Ergebnis gegebenenfalls abzuziehen ist.

Herstellung und Titerstellung der 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung. Man löst 3,2—3,3 g Kaliumpermanganat in 1 l Wasser, erhitzt die Lösung 10 Minuten zum Sieden, filtriert sie, wenn nötig, durch Glaswolle und stellt ihren Titer fest, der bei Aufbewahrung in verschlossener dunkler Flasche ziemlich beständig ist. Die Titerstellung kann durch chemisch reines metallisches Eisen oder durch Oxalsäure, Natriumoxalat und MOHR'SCHES Salz erfolgen. Zuverlässig und am einfachsten ist die Titerstellung durch MOHR'SCHES Salz (kryst. Ferro-ammoniumsulfat,  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), welches genau  $\frac{1}{7}$  seines Gewichts an Eisen enthält, indem man eine entsprechende Menge davon in Wasser unter Zusatz von etwas Schwefelsäure löst, wobei man durch einen Kohlendioxydstrom den Zutritt der Luft abhält. Ist die Lösung genau 0,1-normal (= 3,1606 g wirksames Kaliumpermanganat im l enthaltend), so entspricht 1 ccm = 5,6 mg Fe = 7,2 mg FeO = 8,0 mg  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

γ) Bestimmung kleiner Eisenmengen. α) Colorimetrisches Verfahren nach C. v. D. HEIDE und K. HENNIG<sup>1</sup>. 5—10 g der Substanz (bei Flüssigkeiten wie Wein etwa 50 ccm) werden verkohlt und mit verd. Schwefelsäure erwärmt; die Lösung wird durch ein aschefreies Filter filtriert und einige Male mit heißem Wasser ausgewaschen. Zunächst wird das Filter mit den Rückständen in der Platinschale verascht. Dann führt man auch das Filtrat in die Platinschale über, versetzt mit 0,5 ccm Fluorwasserstoffsäure, dampft auf dem Wasserbade ein und erhitzt schließlich auf freier Flamme so lange, bis Schwefelsäuredämpfe zu entweichen beginnen. Beim Abrauchen ist besonders auf das vollständige Vertreiben der Fluorwasserstoffsäure zu achten, da sie die spätere Rhodaneisenreaktion stören würde. Den Rückstand nimmt man mit 5 ccm verd. Salzsäure auf, spült in ein 100 ccm-Meßkölbchen über, versetzt mit 10 ccm 10%iger Salzsäure, 5 ccm Kaliumpersulfatlösung (2%) und 10 ccm Kaliumrhodanidlösung (10%). Dann füllt man mit Wasser bis zur Marke auf und colorimetriert diese Lösung.

Hierzu sind folgende Lösungen erforderlich.

Lösung I. 1,7557 g Ferroammoniumsulfat werden in einer Porzellanschale mit verd. Salpetersäure wiederholt eingedampft. Der Rückstand wird mit Salzsäure mehrmals aufgenommen und eingedampft, bis die Salpetersäure völlig vertrieben ist. Man führt die Lösung in einen 250 ccm-Kolben über und füllt mit Wasser zur Marke auf. 1 ccm enthält 1 mg Eisen (Fe).

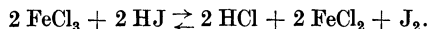
Lösung II. 50 ccm der Lösung I werden zu 500 ccm verdünnt. 1 ccm enthält 0,1 mg Eisen.

<sup>1</sup> C. v. D. HEIDE u. K. HENNIG: Z. 1933, 66, 347. — Vgl. auch L. MAQUENNE: Bull. Soc. Chim. de France 1921 [4], 29, 585; C. 1922, II, 1156.

Man gibt 1, 2 und 3 ccm der Lösung II in je einen 100 ccm-Meßkolben, versetzt mit 15 ccm Salzsäure (10%), 5 ccm einer Persulfatlösung (2%) und 10 ccm Kaliumrhodanidlösung (10%) und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Man vergleicht die Färbung der zu untersuchenden Lösung mit derjenigen der Standardlösungen, von denen man erforderlichenfalls noch schwächer oder stärker gefärbte Lösungen herstellt.

E. ELSER<sup>1</sup> empfiehlt eine colorimetrische Bestimmung des Eisens in Honigaschen als Berlinerblau mit Kaliumferrocyanid.

ββ) Jodometrisches Verfahren<sup>2</sup>. Es beruht auf der umkehrbaren Reaktion



Damit sie von links nach rechts quantitativ verläuft, muß ein großer Überschuß an Jodwasserstoff vorhanden sein.

20—30 g feste Substanz (bei Flüssigkeiten wie Wein etwa 200 ccm) werden verascht. Die Asche wird in starker eisenfreier Salzsäure gelöst und unter Nachspülen mit Wasser in einer gut glasierten Porzellanschale nach Zugabe von 3—4 ccm salpetersäurefreier Wasserstoffsperoxydlösung (3%) auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht, mit wenig Wasser aufgenommen und wieder zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mit 0,3 ccm eisenfreier Salzsäure ( $d = 1,19$ ) durchfeuchtet und mit möglichst wenig Wasser in eine 200 ccm fassende Glasflasche mit eingeschliffenem Glasstopfen übergespült. Man setzt zu der Flüssigkeit, deren Raummenge 20 ccm nicht übersteigen soll, 1—1,5 g festes jodatfreies Kaliumjodid hinzu, verschließt die Flasche und erwärmt 5—10 Minuten auf 60°. Alsdann versetzt man mit 100 ccm kaltem Wasser und Stärkelösung und titriert die Menge des ausgeschiedenen Jods mit 0,01 N.-Natriumthiosulfatlösung bis zum erstmaligen Verschwinden der Farbe der Jodstärke. 1 ccm 0,01 N.-Natriumthiosulfatlösung entspricht 0,558 mg Eisen (Fe).

b) Aluminium. In der Regel ermittelt man das Aluminium in Gemischen mit Eisen und Phosphorsäure, wie es in den Aschen von Lebensmitteln vorliegt, nach dem oben (S. 1223) beschriebenen Verfahren indirekt durch Differenzberechnung.

Für die direkte Bestimmung, namentlich kleiner Mengen von Aluminium sind unter anderen folgende Verfahren in Vorschlag gebracht worden:

α) Bestimmung als Aluminiumphosphat<sup>3</sup>. 50—100 g Substanz (bei Flüssigkeiten, z. B. bei Wein 500 ccm) werden in 3 Teilen in derselben Platinschale nacheinander in der üblichen Weise (unter Ausziehen mit Wasser) verascht und der unlösliche Rückstand weiß gebrannt. Man nimmt diesen mit konz. Salzsäure auf, fügt die gesamten wäßrigen Auszüge hinzu, dampft zur Abscheidung der Kieselsäure auf dem Wasserbade zur Trockne und erhitzt bis kein Geruch nach Salzsäure mehr wahrzunehmen ist, durchfeuchtet den Rückstand mit konz. Salzsäure, fügt nach kurzem Stehen etwas Wasser hinzu und bringt von neuem in der beschriebenen Weise zur Trockne. Man durchfeuchtet den Rückstand mit wenig konz. Salzsäure und nimmt nach kurzem Stehen mit Wasser auf. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen der Kieselsäure mit kochendem Wasser versetzt man Filtrat und Waschwasser in einem Becherglase nach dem Erkalten zunächst mit 5 ccm 10%iger Ammoniumchloridlösung, hierauf

<sup>1</sup> E. ELSER: Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene 1925, 16, 38.

<sup>2</sup> K. MOHR: Ann. Chem. u. Pharm. 105, 53. — Vgl. Anweisung zur chemischen Untersuchung des Weines vom 9. Dezember 1920. Zentralbl. f. das Deutsche Reich 1920, 48, 1601; Gesetze und Verordnungen, betreffend Nahrungs- und Genußmittel, 1921, 13, 93.

<sup>3</sup> Anweisung zur chemischen Untersuchung des Weines vom 9. Dezember 1920. Zentralblatt f. das Deutsche Reich 1920, 48, 1601; Gesetze und Verordnungen, betreffend Nahrungs- und Genußmittel, 1921, 13, 93.

mit einigen Tropfen Methylorangefärbung und zuletzt vorsichtig mit Ammoniak bis zur eben noch merklichen sauren Reaktion. Zu der etwa 60 ccm betragenden Flüssigkeit gibt man 20 ccm Ammoniumacetatlösung (10%) hinzu, erhitzt langsam auf 70—80° und filtriert den ausgeschiedenen Niederschlag ab, sobald er flockig geworden ist. Man wäscht zweimal mit kochendem Wasser aus und löst dann einschließlich der im Becherglase haften gebliebenen Anteile den Niederschlag auf dem Filter in wenig kochender, stark verdünnter Salzsäure. Alsdann wäscht man das Filter mit wenig kochendem Wasser vollständig aus, sammelt Lösung und Waschwasser in einem kleinen ERLÉNMEYER-Kolben, fügt nach dem Erkalten 2 ccm Ammoniumchloridlösung (10%), sowie 0,3 g Citronensäure hinzu, macht mit Ammoniak alkalisch und läßt einige Zeit stehen. Entsteht ein Niederschlag, so bringt man ihn durch vorsichtigen Zusatz von Salzsäure in Lösung, setzt noch etwas Citronensäure hinzu und macht wieder mit Ammoniak alkalisch. Bleibt die alkalische Flüssigkeit dauernd klar, so versetzt man sie mit einer nicht zu großen, aber zur Fällung des Eisens sicher ausreichenden Menge Ammoniumsulfidlösung und läßt das verschlossene Kölbchen an einem warmen Orte stehen. Man filtriert von dem zusammengeballten Ferrosulfid ab und wäscht gut mit heißem ammoniumsulfidhaltigem und im Anfang auch ammoniumchloridhaltigem Wasser aus. Filtrat und Waschwasser werden mit verd. Schwefelsäure deutlich angesäuert. (Es muß so viel Schwefelsäure vorhanden sein, daß beim Eindampfen alles Chlor des vorhandenen Ammoniumchlorids als Salzsäure entweichen kann.) Nach dem Kochen filtriert man vom ausgeschiedenen Schwefel ab und wäscht aus. Filtrat und Waschwasser werden in einer Platinschale zur Trockne eingedampft, verkohlt und die Kohle nach Möglichkeit weiß gebrannt. Man befeuchtet den Verbrennungsrückstand mit starker Salzsäure, fügt nach einigem Stehen Wasser hinzu, filtriert von etwaigen Kohleflittern ab und bringt das klare Filtrat und die Waschwässer unter Nachspülen mit Wasser in ein Becherglas. Man versetzt zunächst mit einigen Tropfen Dinatriumhydrophosphatlösung, dann mit einigen Tropfen Methylorangefärbung und schließlich vorsichtig mit Ammoniak bis zur eben noch wahrnehmbaren sauren Reaktion. Dann gibt man 20 ccm Ammoniumacetatlösung (10%) hinzu und erhitzt langsam auf 70—80°. Den abgeschiedenen Niederschlag filtriert man, sobald er flockig geworden ist, ab, wäscht ihn vollständig mit kochendem Wasser aus, und wägt ihn schließlich nach Veraschung des Filters als Aluminiumphosphat ( $\text{AlPO}_4$ ).  $\text{AlPO}_4 \times 0,222 = \text{Aluminium (Al)}$ .

$\beta$ ) Bestimmung mit 8-Oxychinolin. Nach E. JUNG<sup>1</sup> verfährt man zur Bestimmung des Aluminiums neben Eisen, wie folgt: Die nach der oben (S. 1223) beschriebenen Acetatmethode gewonnene, Eisen, Aluminium und Phosphorsäure enthaltende Fällung wird in verd. Salzsäure gelöst. Die schwach salzsaure Lösung wird mit einer genügenden Menge Weinsäure versetzt und darauf Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis die Lösung schwach opalisiert. Darauf setzt man Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzu und leitet wieder Schwefelwasserstoff ein. Man filtriert vom Eisensulfidniederschlag ab und bestimmt das Eisen durch Umfällen mit Ammoniak (S. 1226). Im Filtrat vom Sulfidniederschlag wird das Aluminium durch Fällung mit 8-Oxychinolin bestimmt. Zu diesem Zweck säuert man das Filtrat schwach an und kocht, bis aller Schwefelwasserstoff entwichen ist, filtriert vom abgeschiedenen Schwefel ab und macht mit Ammoniak alkalisch. Nach dem Erwärmen auf 70° setzt man die erforderliche Menge Fällungsmittel (5 g 8-Oxychinolin in 12 g Eisessig

<sup>1</sup> E. JUNG: Zeitschr. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde A 1932, 26, 1. — Vgl. auch HAHN und Mitarbeiter: Zeitschr. analyt. Chem. 1927, 71, 122 u. 225; ferner auch BERG: Zeitschr. analyt. Chem. 1927, 71, 369 u. 1929, 76, 197. — LEHMANN: Arch. Hygiene 1929, 102, 349 u. 1931, 106, 309.

unter schwachem Erwärmen gelöst und auf 100 ccm verdünnt) hinzu und rührt  $\frac{1}{2}$  Minute. Nach kurzer Zeit scheidet sich ein gelblichgrüner Niederschlag des Aluminiums ab. Am Ende der Reaktion nimmt die überstehende Flüssigkeit einen schwach orangegelben Farbton an. Wenn die Lösung farblos oder gelb ist, muß noch Fällungsmittel zugesetzt werden; ein Überschuß ist jedoch zu vermeiden. Man hält die Lösung auf  $70^{\circ}$ , da sich sonst überschüssiges Oxychinolinacetat abscheidet. Die Bestimmung des Aluminiumniederschlages kann nun gewichtsanalytisch durch Wägen des getrockneten Niederschlages erfolgen, oder maßanalytisch durch bromometrische Titration des an das Aluminium gebundenen Oxychinolinrestes.

Zur gewichtsanalytischen Bestimmung wird der Niederschlag heiß durch einen Berliner Porzellanfiltertiegel A 2 filtriert und mit heißem Wasser (unter  $70^{\circ}$ ) so lange ausgewaschen, bis das Filtrat farblos ist. Der Niederschlag wird bei  $110^{\circ}$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Er enthält 5,87% Aluminium (Al) = 11,1% Aluminiumoxyd ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

Zur maßanalytischen Bestimmung löst man den ausgewaschenen Niederschlag in Salzsäure (10%) und titriert mit 0,2 N.-Kaliumbromatlösung unter Zusatz von 0,5 g Kaliumbromid und einigen Tropfen Methylrot. Gegen Ende der Titration werden nochmals 2—3 Tropfen Methylrot zugesetzt. Der Umschlagspunkt ist jedoch nicht sehr scharf; es muß daher der Überschuß an Bromatlösung nach Zusatz von etwas Kaliumjodid mit Natriumthiosulfatlösung und Stärke zurücktitriert werden. 1 ccm 0,2 N.-Kaliumbromatlösung = 0,4495 mg Aluminium (Al).

F. ALTEN, H. WEILAND und H. LOOFMANN<sup>1</sup> haben auch ein colorimetrisches Verfahren angegeben, mit welchem 20—500  $\gamma$  Aluminium bestimmt werden können.

$\gamma$ ) Colorimetrische Bestimmung mit Aurintricarboxylsäure. Das Verfahren beruht darauf, daß aus der bei möglichst niedriger Temperatur hergestellten Asche das Aluminium als Phosphat, und zwar an einen Überschuß von Ferriphosphat adsorbiert, zur Ausfällung gebracht und unter Lackbildung mit dem Farbstoff Aurintricarboxylsaures Ammonium („Aluminon“) colorimetriert wird.

Die Bestimmung geschieht nach dem Vorschlage von G. J. Cox und Mitarbeitern<sup>2</sup>, wie folgt:

5—150 g Substanz werden in einer Platinschale bei  $110^{\circ}$  getrocknet, dann in einen kalten elektrischen Ofen gebracht, den man darauf sehr langsam während eines Tages auf Rotglut erhitzt. Während der folgenden Nacht wird der Verbrennungsprozeß zu Ende geführt, indem man einen Sauerstoffstrom langsam durch den Ofen leitet. Man löst die Asche in 10 ccm konz. Salzsäure und 25 ccm Wasser und dampft die Lösung zur Abscheidung der Kieselsäure zur Trockne. Der Rückstand wird mit 10 ccm 3 N.-Salzsäure und 25 ccm Wasser 5 bis 10 Minuten aufgekocht. Darauf zentrifugiert man 5 Minuten bei 1800 Umdrehungen und dekantiert in einen 100 ccm-ERLENMEYER-Kolben. Ist ein Rückstand vorhanden, so wird dieser nochmals ausgewaschen. Hinterbleiben Kohlentelchen, so trocknet man den Rückstand in einer Platinschale und beseitigt daraus die Kieselsäure nach Zusatz von Fluorwasserstoffsäure und Schwefelsäure durch leichtes Glühen. Der Rückstand wird mit gleichen Teilen Kalium-Natriumcarbonat geschmolzen, die erhaltene Masse gelöst und die Lösung mit der Hauptlösung vereinigt. Zu der Aschenlösung werden nunmehr 1 ccm Salpetersäure

<sup>1</sup> F. ALTEN, H. WEILAND u. H. LOOFMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1933, 46, 668.

<sup>2</sup> G. J. COX, E. W. SCHWARTZE, R. M. HANN, R. B. UNANGST u. J. L. NEAL: Ind. Eng. Chem. 1932, 24, 403; Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 92, 307. — Vgl. ferner O. B. WINTER, W. E. THRUN u. O. D. BIRD: Journ. Amer. Chem. Soc. 1929, 51, 2721 u. 2964.

( $d = 1,42$ ) und 1 ccm 0,1 N.-Ferrisulfatlösung zugesetzt. Man dampft auf etwa 10 ccm ein, verdünnt mit Wasser auf 60 ccm und versetzt mit 5 ccm N.-Mononatriumphosphatlösung sowie 2 ccm Bromphenolblaulösung (0,04%). Nach Zugabe von 7 N.-Ammoniak entsteht ein Niederschlag. Die Flüssigkeit wird durch Zusatz von 3 N.-Natriumacetatlösung auf  $p_H = 4,2$  gebracht und wie oben zentrifugiert. Der aus Eisen- und Aluminiumphosphat bestehende Niederschlag wird in 0,5 ccm 6 N.-Salzsäure, 1,25 ccm Eisessig und ungefähr 15 ccm heißem Wasser aufgelöst. Unter Umrühren werden hierauf 5 ccm 6 N.-Natronlauge zugesetzt und unter öfterem Umrühren läßt man 1 Stunde stehen. Das dabei ausgefällte Eisenhydroxyd wird wiederum abzentrifugiert. Die Lösung wird durch ein 9 ccm-Filter dekantiert und mit 1,2 N.-Natronlauge und dann mit heißem Wasser bis zur Alkalifreiheit ausgewaschen. Man filtriert dabei in einen 100 ccm-Kolben, der 1 ccm 6 N.-Salzsäure enthält. Den im Zentrifugenrohr verbleibenden Rückstand behandelt man nach dem Aufrühren mit heißem Wasser, zentrifugiert und gibt die Waschwässer durch das Filter zu der Hauptlösung. Nach dem Abkühlen wird die Lösung gegen Lackmus schwach angesäuert und auf 100 ccm verdünnt. 20 ccm dieser Lösung bringt man in einen trockenen 250 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit Glasstopfen und setzt 25 ccm einer Lösung zu, die in 1 l 1 Mol Ammoniumacetat, 1 Mol Ammoniumchlorid, 80 ccm einer 0,1%igen Lösung von Aurintricarboxylsaurem Ammonium (Aluminon) und 60 ccm 6 N.-Salzsäure enthält. Der  $p_H$ -Wert dieser Lösung schwankt zwischen 4,5 und 5,5. Auf den ERLENMEYER-Kolben setzt man einen gut passenden, tief in den Kolben reichenden Innenkühler und kocht dann 1 Minute auf. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur fügt man genügend 1,6 N.-Ammoniumcarbonatlösung (4,8—5 ccm) unter Umschwenken zu, bis ein  $p_H$ -Wert von 7,1 erreicht wird. Man schüttelt dann 20mal bei geschlossenem Kolben um und läßt von Zeit zu Zeit die Kohlensäure entweichen. Der Kolben bleibt dann 20 Minuten stehen, damit sich der Farbstoffüberschuß entfärbt. Die Lösung wird nun in einen DUBOSCQ-Colorimeter mit einer Lösung verglichen, die in 500 ccm 5 ccm einer 0,04%igen Thymolblaulösung und 8 ccm 6 N.-Salzsäure enthält. Die Aluminiumlösung wird stets auf 30 mm eingestellt, während man die Standardlösung variiert. Mittels der obenstehenden Kurve (Abb. 6) läßt sich dann der Aluminiumgehalt ermitteln, der in dem verwendeten aliquoten Teil der Lösung vorhanden ist.

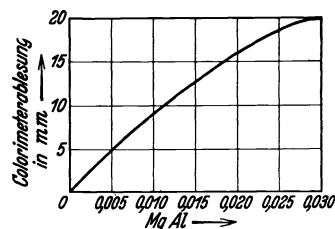


Abb. 6. Kurve zur Ermittlung des Aluminiumgehaltes nach Cox und Mitarbeitern.

c) **Mangan.** Colorimetrische Bestimmung als Kaliumpermanganat. Geringe Mengen Mangan werden nach S. 1225 als Mangansulfid, im übrigen aber meist nach dem Verfahren von H. MARSHALL<sup>1</sup> nach Oxydation mit Ammonium- oder Kaliumpersulfat<sup>2</sup> colorimetrisch als Kaliumpermanganat bestimmt. Das Verfahren, das bisher vielfach zur Bestimmung geringer Mengen von Mangan im Wasser<sup>3</sup> verwendet wurde, wird nach C. v. D. HEIDE und K. HENNIG<sup>4</sup>, wie folgt, ausgeführt:

<sup>1</sup> H. MARSHALL: Chem. News 1901, 83, 76; C. 1901, I, 705.

<sup>2</sup> J. T. SKINNER u. W. H. PETERSON (Journ. Biol. Chem. 1930, 88, 347; C. 1930, II, 2810) oxydieren mit Kaliumperjodat.

<sup>3</sup> FR. HAAS: Z. 1913, 25, 392. — E. SCHOWALTER: Z. 1913, 26, 104. — L. HARTWIG u. H. SCHELLBACH: Z. 1913, 26, 439. — H. LÜHRIG: Chem.-Ztg. 1914, 38, 781. — J. TILLMANS u. H. MILDNER: Journ. Gasbel. u. Wasserversorg. 1914, 57, 496; Z. 1918, 35, 311.

<sup>4</sup> C. v. D. HEIDE u. K. HENNIG: Z. 1933, 66, 346. — Siehe auch E. ELSENER: Mitt. Lebensmittelunters. u. Hygiene 1925, 16, 43.



Man verkohlt 5—10 g Substanz (bei Flüssigkeiten, z. B. Wein, 50 ccm). Den Rückstand erwärmt man mit verd. Schwefelsäure, filtriert durch ein asche-freies Filter und wäscht einige Male mit heißem Wasser aus. Zunächst wird das Filter samt Rückständen in der Platinschale verascht; dann führt man auch das Filtrat in die Platinschale über, versetzt mit 0,5 ccm Flußsäure, dampft auf dem Wasserbade ein und erhitzt schließlich auf freier Flamme so lange, bis Schwefelsäuredämpfe zu entweichen beginnen. Man nimmt den Salzurückstand mit 10 ccm verd. Salpetersäure auf und spült mit solcher in ein 25 ccm-Meßkölbchen mit einem Glasstopfen über. Darauf setzt man 0,5 g Kaliumpersulfat und 2 Tropfen Silbernitratlösung (10%) hinzu und füllt mit Wasser fast bis zum Kolbenhals auf. Die Lösung muß vollständig klar bleiben, d. h. Chloride dürfen auch nicht in Spuren vorhanden sein. Hierauf stellt man das Kölbchen in ein siedendes Wasserbad. Vorhandene Mangansalze werden hierbei zu Kaliumpermanganat oxydiert. Nach dem Erkalten füllt man mit Wasser, das man vorher unter Zusatz von Salpetersäure, Persulfat und Silbernitrat aufgeköcht hat und das ebenfalls vollkommen frei von Chloriden sein muß, bis zur Marke auf. Diese Lösung wird colorimetriert. Hierzu verwendet man als Standardlösung eine wäßrige chloridfreie Lösung, welche 0,10152 g reinstes Mangansulfat ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) in 250 ccm enthält<sup>1</sup>; 1 ccm davon enthält 0,1 mg Mangan (Mn). Von dieser Lösung stellt man drei Vergleichslösungen her, indem man in je ein 25 ccm-Meßkölbchen 1, 3 und 5 ccm der Standardlösung (= 0,1, 0,3 und 0,5 mg Mn) gibt. Sodann verfährt man mit diesen drei Kölbchen wie oben für die Analysenlösung beschrieben ist. Die Analysenlösung vergleicht man mit derjenigen Lösung, die ihr in der Farbtiefe am ähnlichsten ist. Gegebenenfalls sind stärkere oder schwächere Vergleichslösungen herzustellen.

**d) Calcium.**  $\alpha$ ) Fällung als Calciumoxalat. Soll das Calcium in neutraler oder ammoniakalischer Lösung<sup>2</sup> als Calciumoxalat gefällt werden, so darf die Lösung außer Alkalien und geringeren Mengen Magnesium<sup>3</sup> keine anderen Metalle und auch keine Phosphorsäure enthalten.

Die neutrale oder schwach ammoniakalische Lösung (etwa 200 ccm) wird mit Ammoniumchlorid versetzt, zum Sieden erhitzt und mit einer siedenden Lösung von Ammoniumoxalat gefällt. Nach 4—6 Stunden Stehen wird die überstehende klare Flüssigkeit zunächst durch ein Papierfilter oder einen Filtertiegel abgesehen, der Niederschlag dann mehrmals durch warmes ammoniumoxalathaltiges Wasser ausgewaschen, dann auf das Filter gebracht und bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit ebensolchem Wasser nachgewaschen. Die Bestimmung des so abgeschiedenen Calciumoxalates kann dann — abgesehen von der weniger empfehlenswerten Bestimmung als Calciumcarbonat durch schwaches Glühen — in folgender Weise erfolgen:

$\alpha\alpha$ ) Als Calciumoxyd (CaO). Diese Bestimmung ist die einfachste; der Calciumoxalatniederschlag wird in bedecktem Tiegel zunächst über dem Brenner, dann vor dem Gebläse je nach seiner Menge 15—20 Minuten geblüht und als Calciumoxyd (CaO) zur Wägung gebracht.

<sup>1</sup> Man stellt diese Lösung zweckmäßig durch Verdünnung einer zehnfach stärkeren Lösung mit Wasser her.

<sup>2</sup> In schwach essigsaurer Lösung, z. B. in dem Filtrat nach a),  $\alpha$ ) auf S. 1223, kann die Fällung auch in Lösungen erfolgen, die größere Mengen Magnesium und Phosphorsäure enthalten.

<sup>3</sup> Die Menge des Magnesiums darf nach O. BRUNCK (Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 94, 81) 0,07—0,08 g in 100 ccm Lösung nicht übersteigen; in diesem Falle ist das Verhältnis von Calcium und Magnesium zueinander von untergeordneter Bedeutung. Im anderen Falle fällt mit dem Calciumoxalat etwas Magnesiumoxalat mit aus, das dann durch Lösen der Oxalate in Salzsäure und nochmalige Fällung des Calciumoxalates beseitigt wird.

$\beta\beta$ ) Als Calciumoxalat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Das Verfahren ist besonders bei großen Calciummengen von S. GOY<sup>1</sup> empfohlen worden und wird zweckmäßig im Filtertiegel ausgeführt. Man trocknet den Niederschlag nach O. BRUNCK<sup>1</sup> entweder einige Stunden bei 60—70° vor oder wäscht ihn je dreimal mit Alkohol und Äther nach, trocknet ihn dann in beiden Fällen 1 Stunde bei 105—110° und bringt ihn als wasserhaltiges Calciumoxalat ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) zur Wägung. Durch Multiplikation mit 0,3838 erhält man die Menge des Calciumoxyds (CaO).

$\gamma\gamma$ ) Maßanalytisch mit Kaliumpermanganat. Man spült den noch feuchten Calciumoxalatniederschlag mit Wasser in das Fällungsbecherglas zurück, wäscht das Filter mehrmals mit warmer verdünnter Schwefelsäure aus, setzt noch 20 ccm Schwefelsäure (1 : 1) hinzu, verdünnt mit heißem Wasser auf 300—400 ccm und titriert die Oxalsäure mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung, von der 1 ccm 2,0 mg Calcium (Ca) und 2,8 mg Calciumoxyd (CaO) entspricht.

J. BODNÁR u. L. BARTA<sup>2</sup> verwenden dieses Verfahren zur mikrochemischen Bestimmung des Calciums im Tabak.

Statt den Oxalsäuregehalt des Calciumoxalat-Niederschlages zu bestimmen kann man das Verfahren dadurch vereinfachen, daß man die Fällung mit einer bestimmten Menge titrierter Oxalsäure- oder Oxalatlösung, z. B. 0,1 N.-Oxalsäure- oder Ammoniumoxalatlösung, vornimmt, auf ein bestimmtes Volumen auffüllt, filtriert und in einem aliquoten Teil des Filtrates die unverbrauchte Oxalsäuremenge mit Kaliumpermanganatlösung titriert. Der Calciumgehalt ergibt sich dann aus der Differenz der angewandten und der unverbrauchten Oxalsäuremenge<sup>3</sup>.

$\beta$ ) Fällung als Calciumsulfat ( $\text{CaSO}_4$ ). Man versetzt die zu untersuchende Lösung, welche möglichst wenig freie Salzsäure enthalten soll, mit überschüssiger verd. Schwefelsäure, hierauf mit dem vierfachen Volumen Alkohol, läßt 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und filtriert. Der Niederschlag wird mit 70%igem Alkohol ausgewaschen und getrocknet. Man verbrennt zunächst das vom Niederschlage möglichst befreite Filter im Platintiegel, gibt den Niederschlag hinzu, glüht schwach und wägt als Calciumsulfat ( $\text{CaSO}_4$ );  $\text{CaSO}_4 \times 0,2943 = \text{CaO}$ .

$\gamma$ ) Colorimetrische Bestimmung mit Pikrolonsäure. F. ALTEN, H. WEILAND und E. KNIPPENBERG<sup>4</sup> haben ein colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von 20—150  $\gamma$  Calcium in 1 ccm Lösung über das Calciumpikrolonat angegeben, das durch die Gegenwart von Eisen, Aluminium, Magnesium, Kalium, Natrium und Ammonium, sowie von Phosphorsäure nicht beeinflußt wird.

e) Magnesium.  $\alpha$ ) Bestimmung als Magnesiumpyrophosphat nach B. SCHMITZ<sup>5</sup>. Man versetzt die saure, ammoniumsalthaltige Lösung mit einem Überschuß von Natrium- oder Ammoniumphosphat, fügt einige Tropfen Phenolphthalein hinzu, erhitzt zum Sieden und versetzt die heiße Lösung tropfenweise unter beständigem Umrühren bis zur bleibenden Rotfärbung, dann mit  $\frac{1}{5}$  ihres Volumens Ammoniak (10%), läßt erkalten, filtriert nach einigem Stehen durch einen Platin-GOOCH- oder NEUBAUER-Tiegel, wäscht mit 2,5%igem Ammoniak aus, trocknet und glüht bei starker Rotglut. Nach dem Erkalten wägt man das gebildete Magnesiumpyrophosphat ( $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ );  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 0,3622 = \text{MgO}$ .

$\beta$ ) Bestimmung mit 8-Oxychinolin nach K. NEHRING<sup>6</sup>. Zu der Lösung bzw. dem Filtrat der Calciumbestimmung als Oxalat gibt man etwa

<sup>1</sup> S. GOY: Chem.-Ztg. 1913, **37**, 1337. — Vgl. ferner L. W. WINKLER: Zeitschr. angew. Chem. 1918, **31**, 80 u. 83; V. RODT u. E. KINDSCHEER: Chem.-Ztg. 1924, **48**, 953; O. BRUNCK: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, **94**, 81.

<sup>2</sup> J. BODNÁR u. L. BARTA: Biochem. Zeitschr. 1930, **227**, 429.

<sup>3</sup> Derartige Verfahren sind vielfach zur Bestimmung des Calciums im Wasser vorgeschlagen. Vergl. J. GROSSFELD: Z. 1917, **34**, 325.

<sup>4</sup> F. ALTEN, H. WEILAND u. E. KNIPPENBERG: Biochem. Zeitschr. 1933, **265**, 85.

<sup>5</sup> B. SCHMITZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1906, **45**, 512. — Vgl. ferner G. JÖRGENSEN: Daselbst S. 278.

<sup>6</sup> K. NEHRING: Zeitschr. Pflanzenernährung Düngung und Bodenkunde A 1931, **21/22**, 300. — Vgl. auch BERG: Zeitschr. analyt. Chem. 1927, **71**, 23 sowie HAHN u. VIEWEG: Zeitschr. analyt. Chem. 1917, **71**, 122.

15 ccm 2 N.-Ammoniumchloridlösung und 10 ccm 2 N.-Ammoniak hinzu und erhitzt auf 75°. Darauf versetzt man tropfenweise mit einer alkoholischen Oxychinolinlösung (4%) im geringen Überschuß. Gelbfärbung der Lösung zeigt den Überschuß an. Für 10 mg Magnesium sind etwa 3,3 ccm der Oxychinolinlösung erforderlich. Man erhitzt kurz zum Sieden, filtriert nach etwa 15 bis 20 Minuten und wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser, dem eine geringe Menge Ammoniak zugesetzt ist, aus. Die Bestimmung kann entweder gewichts- oder maßanalytisch erfolgen.

Zur gewichtsanalytischen Bestimmung filtriert man am besten durch einen Glasfildertiegel (3/5—7) und trocknet nach dem Auswaschen 1—2 Stunden bei 140°. Durch Multiplikation mit 0,0778 erhält man die Menge an vorhandenem Magnesium.

Für die maßanalytische Bestimmung filtriert man durch ein Wattefilter, löst nach dem Auswaschen in heißer Salzsäure (10%) und titriert dann kalt nach Zusatz von 0,5 g Kaliumbromid und ein paar Tropfen Methylrot mit 0,1 N.-Kaliumbromatlösung. Es tritt Farbumschlag nach Gelb ein. Gegen Ende der Titration setzt man noch 2—3 Tropfen Methylrot hinzu. Da der Umschlagspunkt nicht scharf ist, muß der Überschuß an Bromatlösung nach Zusatz von etwas Kaliumjodid mit Thiosulfatlösung und Stärke als Indikator zurücktitriert werden. 1 ccm 0,1 N.-Bromatlösung = 0,304 mg Mg.

F. ALTEN, H. WEILAND u. B. KURMIES<sup>1</sup> geben ein colorimetrisches Verfahren an, nach welchem 10—500  $\gamma$  Magnesium mit Oxychinolin bestimmt werden können.

f) Kalium. Zur Bestimmung verwendet man die klare ammoniumfreie Lösung<sup>2</sup> der nach S. 1225 erhaltenen Alkalichloride, bzw. man stellt aus andersartigen Lösungen zunächst die Alkalichloride dar, indem man z. B. aus Sulfaten die Schwefelsäure nach S. 1251 und aus Phosphaten die Phosphorsäure nach S. 1257 als basisches Ferriphosphat abscheidet.

$\alpha$ ) Bestimmung als Kaliumchloroplatinat ( $K_2[PtCl_6]$ ). Man versetzt die Kaliumchloridlösung mit einer genügenden Menge<sup>3</sup> einer möglichst neutralen konz. wäßrigen Lösung von Platinchlorid-Chlorwasserstoffsäure und verdampft entweder in einer Porzellanschale oder in einem Becherglase im Wasserbade, das nicht sieden soll, zur Trockne<sup>4</sup>. Hat man, um alle Alkalien in Chloride umzuwandeln, vor dem Verdampfen Salzsäure zugesetzt, so muß so lange im Wasserbade erhitzt werden, bis der Rückstand nicht mehr nach Salzsäure riecht. Man durchfeuchtet den Rückstand mit einigen Tropfen Wasser und versetzt dann mit Alkohol von 80—90 Vol.-%<sup>5</sup>, bedeckt die Schale oder das Becherglas mit einer Glasplatte, läßt einige Stunden stehen und rührt von Zeit zu Zeit mit einem Glasstabe um. Die Lösung muß tiefgelb gefärbt — andernfalls ist zu wenig Platinchlorid-Chlorwasserstoffsäure zugesetzt — und der Niederschlag krystallinisch sein. Er wird entweder auf einem bei 130° getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, mit 80—90%igem Alkohol ausgewaschen, nach völligem Abtropfen des Alkohols bei 130° getrocknet und gewogen; oder man trocknet das Filter erst bei 80—90°, sammelt den abtrennbaren Niederschlag in einer gewogenen

<sup>1</sup> F. ALTEN, H. WEILAND u. B. KURMIES: Zeitschr. angew. Chem. 1933, 46, 697.

<sup>2</sup> Die Lösung darf aber mit Ammoniak und Ammoniumcarbonat keinerlei Trübung mehr geben.

<sup>3</sup> Die zugesetzte Menge Platinchlorid-Chlorwasserstoffsäure ( $H_2[PtCl_6] \cdot 6 H_2O$ ) muß so groß gewählt werden, daß auch alles Natriumchlorid in das alkohollösliche Natriumchloroplatinat ( $Na_2[PtCl_6] \cdot 6 H_2O$ ) umgesetzt wird, weil sonst Natriumchlorid auskrystallisiert, das in Alkohol unlöslich ist.

<sup>4</sup> Das vollständige Eintrocknen empfiehlt sich deshalb, weil das wasserfreie Natriumchloroplatinat leichter in absol. Alkohol löslich ist als das wasserhaltige Salz.

<sup>5</sup> Von anderer Seite wird absoluter Äthylalkohol — am besten soll Methylalkohol sein — oder gar Äther-Alkohol (1:3) als Lösungsmittel empfohlen. Bei Anwendung von absolutem Alkohol oder von Äther-Alkohol erhält man aber fast nie eine klare Lösung.

Platinschale, wäscht das Filter und nötigenfalls auch die verwendete Schale mit siedendheißem Wasser aus, gibt die Lösung zu den Krystallen in die Platinschale, dampft auf dem Wasserbade zur Trockne, trocknet bei 160° und wägt.

Das Kaliumchloroplatinat kann anstatt auf einem gewogenen Filter auch im GOOCH- oder NEUBAUER-Tiegel gesammelt und gewogen werden; indem man nachher das Kaliumchloroplatinat mit heißem Wasser auswäscht und den Tiegel nach dem Trocknen zurückwägt, erhält man das vorhandene Kaliumchloroplatinat. Oder man sammelt das Kaliumchloroplatinat in einem ALLIHNschen Asbestfilterröhrchen, trocknet den Niederschlag nach genügendem Auswaschen, glüht schwach, reduziert das Kaliumchloroplatinat im Wasserstoffstrom, zieht das Kaliumchlorid mit Wasser aus und kann nun das reduzierte Platin als solches wägen oder das Filtrat eindampfen und das Kalium als Kaliumchlorid bestimmen.

Die Umrechnung auf Kaliumoxyd bzw. Kaliumchlorid geschieht dann, wie folgt<sup>1</sup>:

$$\begin{aligned} \text{Kaliumchloroplatinat} \times 0,3056 \text{ oder Platin} \times 0,7614 & \dots\dots\dots = \text{Kaliumchlorid (KCl)} \\ \text{Kaliumchloroplatinat} \times 0,1931 \text{ oder Platin} \times 0,4812 \text{ oder Kalium-} \\ \text{chlorid} \times 0,6320 & \dots\dots\dots = \text{Kaliumoxyd (K}_2\text{O)} \end{aligned}$$

Statt das Kalium in Form von Kaliumchloroplatinat zu bestimmen, sind, wie schon angegeben, auch verschiedene Vorschläge gemacht, das letztere durch Wasserstoff- oder Leuchtgas zu reduzieren und das entstandene Platin zur Wägung zu bringen, so von J. H. VOGEL und HÄFKE<sup>2</sup>, von H. NEUBAUER<sup>3</sup>, der das frühere FINKENERSche Verfahren abgeändert hat. Diese Verfahren haben den Vorzug, daß man das Kalium auch bei Anwesenheit sonstiger Salze durch Platinchlorid-Chlorwasserstoffsäure ausfällen kann, weil sie mit dem durch die Reduktion entstehenden Kaliumchlorid ausgewaschen werden; auch stört die Anwesenheit von organischen Stoffen nicht, weil sie durch das Glühen des Platins zerstört werden.

$\beta$ ) Bestimmung als Kaliumperchlorat (KClO<sub>4</sub>). Das Verfahren beruht auf der Unlöslichkeit des Kaliumperchlorats und der Löslichkeit des Natriumperchlorats in perchlorsäurehaltigem 97%igem Alkohol<sup>4</sup>.

Nach den Vereinbarungen des Verbandes Landw. Versuchsstationen<sup>5</sup> dampft man die Lösung der Alkalichloride — die etwa 0,5 g Asche entspricht — in einer flachen Glasflasche auf etwa 20 ccm ein und versetzt tropfenweise mit einer 20%igen Perchlorsäure. Erforderlich ist die 1½—1¾fache Menge der zur Umsetzung aller Salze nötigen Perchlorsäure. Man dampft auf dem Wasserbade solange ein, bis kein Geruch nach Salzsäure mehr wahrnehmbar ist und weiße Nebel von Perchlorsäure entweichen. Der Abdampfdruckstand wird nach dem Erkalten mit 15 ccm 96%igem Alkohol übergossen und mit einem am Ende breitgedrückten Glasstab oder einem Pistill sorgfältig sehr fein zerrieben. Nach kurzem Absitzenlassen wird die über dem Kaliumperchlorat stehende Flüssigkeit

<sup>1</sup> Die theoretisch richtigen Faktoren sind 0,3067 bzw. 0,7614 und 0,1941 bzw. 0,4841. Der Niederschlag von Kaliumchloroplatinat hat aber nicht genau die Formel K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>, sondern enthält zu wenig Chlor, dafür noch Sauerstoff und Wasserstoff, die beim Trocknen des Niederschlages nicht als Wasser sich verflüchtigen. Aus dem Grunde wird der obige Faktor als richtig angesehen (vgl. F. T. TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analyt. Chemie, 11. Aufl., Bd. 2, S. 38f., 1930).

<sup>2</sup> J. H. VOGEL u. HÄFKE: Landw. Vers.-Stationen 1896, 47, 97.

<sup>3</sup> H. NEUBAUER: Dasselbst 1901, 51, 38; 1902, 56, 37; 57, 11 u. 461. — Zeitschr. analyt. Chem. 1900, 39, 481.

<sup>4</sup> Nach den Angaben in GMELINS Handbuch der anorganischen Chemie (8. Aufl.) Teil 6 (Chlor), S. 397 u. 400. — J. GROSSFELD: Z. 1929, 58, 219 — enthalten 100 g gesättigte wäßrige Kaliumperchloratlösung 2,02 g KClO<sub>4</sub>. 100 g bei 25° gesättigte Lösungen organischer Lösungsmittel enthalten mg:

| Aceton | Methyl-<br>alkohol | Äthyl-<br>alkohol | n-Propyl-<br>alkohol | n-Butyl-<br>alkohol | i-Butyl-<br>alkohol | Äthyl-<br>acetat | Äther |
|--------|--------------------|-------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------------|-------|
| 155    | 105                | 12                | 10                   | 4,5                 | 5,0                 | 1,5              | 0     |

<sup>5</sup> Landw. Vers.-Stationen 1906, 64, 6.

durch einen GOOCH-Tiegel (NEUBAUER-Tiegel) filtriert. Sodann wird der Rückstand noch zweimal mit 96%igem Alkohol, der 0,2% Überchlorsäure enthält, zerrieben, dekantiert, und endlich wird das Kaliumperchlorat in den Tiegel gebracht und mit 0,2% Überchlorsäure enthaltendem Alkohol ausgewaschen.

Zuletzt spritzt man zur Verdrängung der Perchlorsäure den Niederschlag mit möglichst wenig 96%igem Alkohol ab (das gesamte Filtrat soll etwa 75 ccm betragen) und trocknet ihn bei 120—130°  $\frac{1}{2}$  Stunde lang (Kaliumperchlorat ist nicht hygroskopisch).

Kaliumperchlorat ( $\text{KClO}_4$ )  $\times$  0,5382 = Kaliumchlorid (KCl)

Kaliumperchlorat ( $2 \text{KClO}_4$ )  $\times$  0,3402 = Kaliumoxyd ( $\text{K}_2\text{O}$ ).

Wenn in einer Substanz nur das Kalium ohne Natrium bestimmt werden soll, so läßt sich das Verfahren, weil die perchlorsauren Salze von Barium, Calcium und Magnesium ebenso wie das Natriumperchlorat in Alkohol löslich sind, wesentlich vereinfachen, da dann die vorherige vollständige Entfernung der genannten Basen nicht notwendig ist. Man kann dann nach einem Vorschlage von V. SCHENKE und P. KRÜGER<sup>1</sup> in der salzsauren Lösung die Schwefelsäure mit einem nicht zu großen Überschuß von Bariumchlorid ausfällen, die gesamte Flüssigkeit zur Trockne verdampfen, fein zerreiben und schwach glühen. Durch diese Behandlung werden Eisen, Aluminium und Mangan als basische Salze, ferner Kieselsäure und Phosphorsäure unlöslich. — Zur Bindung der letzteren sind in den meisten Fällen die vorhandenen Basen ausreichend, sonst kann man auch vor dem Eindampfen einige Tropfen Eisenchlorid zusetzen, aber nicht zu viel. — Der Glührückstand wird unter wiederholtem Zerreiben mit heißem Wasser ausgelaugt und in dem mit Salzsäure versetzten Filtrat das Kalium wie vorstehend mit Perchlorsäure bestimmt. Handelt es sich um Salze (z. B. Kalisalze), die kein Eisen, Aluminium, Mangan und keine Phosphorsäure enthalten, so kann man auch das Filtrat nach dem Fällen mit Bariumchlorid eindampfen und nach dem Eindampfen direkt mit Perchlorsäure fällen.

Das Perchloratverfahren ist von zahlreichen Autoren abgeändert worden. Diese Änderungen erstrecken sich in erster Linie auf die Konzentration und Menge der Perchlorsäure sowie auch auf die Konzentration des Alkohols. Unter Berücksichtigung aller dieser Änderungsvorschläge haben G. F. SMITH und J. F. ROSS<sup>2</sup> nachfolgende Vorschrift ausgearbeitet:

Die wäßrige Alkalichloridlösung wird mit der zwei- bis dreifach äquivalenten Menge reiner Perchlorsäure (nicht weniger als 1 ccm 60—70%iger Säure) versetzt und auf einer heißen Platte in einem 150 ccm fassenden Pyrexbecher zur Trockne gebracht. Becher und Inhalt müssen vollkommen trocken sein, und die geringste, an den Wandungen kondensierte Säuremenge muß durch Erhitzen mit direkter Flamme entfernt werden. Nach dem Abkühlen löst man in etwa 2—3 ccm wenig warmem Wasser und verdampft von neuem zur Trockne. Darauf bringt man in den abgekühlten Becher 10—20 ccm Äthylacetat<sup>3</sup>.

Darauf erhält man die Lösung 2—3 Minuten bei Siedetemperatur und dekantiert nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur durch einen gewogenen GOOCH-Tiegel, wäscht dreimal durch Dekantation, löst in wenig heißem Wasser und verdampft wieder zur Trockne.

Die Salze werden nun ein zweites Mal wie oben mit den Lösungsmitteln ausgezogen, in den Tiegel gebracht und 10—15mal mit je 0,5—1 ccm Lösungsmittel gewaschen. Das Becherglas, in welchem die Fällung vorgenommen wurde, ist auszutrocknen und ein etwa vorhandener Rest von Kaliumperchlorat der Hauptmenge zuzufügen. Tiegel und Niederschlag werden einige Minuten bei 110° und schließlich 15 Minuten in der Muffel bei 350°

<sup>1</sup> V. SCHENKE u. P. KRÜGER: Landw. Vers.-Stationen 1907, 67, 145.

<sup>2</sup> G. F. SMITH u. J. F. ROSS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1925, 47, 1780; Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 69, 62. Vgl. ferner auch R. L. MORRIS: Analyst 1920, 45, 349. — J. H. YOE: Ann. Chim. anal. appl. 1925 [2], 7, 193; Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 69, 61. — G. F. SMITH: Journ. Amer. Chem. Soc. 1923, 45, 2072; Zeitschr. analyt. Chem. 1924, 64, 231.

<sup>3</sup> Sind außer Kalium und Natrium noch andere Alkalimetalle vorhanden, so wendet man ein Gemisch von absolutem Äthylalkohol und Äthylacetat an. Auch Gemische von Butylalkohol und Äthylacetat können verwendet werden.

getrocknet und nach dem Erkalten gewogen. Das Erhitzen bei 350° ist unbedingt erforderlich, weil sonst das Kaliumperchlorat nicht vollständig zu trockenem ist. Filtrat und Waschflüssigkeit betragen etwa 35—45 ccm. Bei Abwesenheit von Natrium- oder Lithiumperchlorat kann die zweite Fällung und zweite Extraktion unterbleiben.

γ) Bestimmung mittels Natriumkobaltinitrits ( $\text{Na}_3\text{Co}[\text{NO}_2]_6$ ). Das Verfahren beruht auf der erstmals von L. DE KONINGK<sup>1</sup> beschriebenen Reaktion des Kaliums mit Natriumnitrit und Kobaltchlorür in essigsaurer Lösung. Durch Einwirkung von Natriumkobaltinitrit auf Kaliumsalze bildet sich hierbei ein gelbes komplexes, in Wasser schwer lösliches Dikalium-natrium-kobaltinitrit.

Eine ähnliche Reaktion geben Ammonium, Lithium, Thallium, Rubidium und Caesium, dagegen stören Calcium, Magnesium, Eisen, Aluminium, Mangan, Chrom, Zink und Nickel, ferner Schwefelsäure und Salpetersäure die Reaktion nicht. Phosphorsäure in größeren Mengen wirkt störend.

Die Zusammensetzung des komplexen Salzes zeigt je nach seiner Darstellung beträchtliche Schwankungen; infolgedessen werden nur bei genau festgelegter Arbeitsweise übereinstimmende Ergebnisse erhalten.

Die Reaktion wird vorwiegend angewendet zur Anreicherung des Kaliums aus Gemischen mit viel Natriumchlorid — wobei dann das Kalium in der angereicherten Salzlösung nach einem der Verfahren α) und β) bestimmt wird — und zur Bestimmung geringer Mengen von Kalium in organischen Substanzen.

Die Bestimmung des Kaliums geschieht in letzterem Falle entweder durch Wägung des komplexen Salzes oder durch Oxydation seiner Salpetrigen Säure mittels Kaliumpermanganats oder durch colorimetrische Mikrobestimmung der Salpetrigen Säure.

αα) Anreicherung der Kaliumsalze. O. LÜNING und H. HAUTOG<sup>2</sup> haben das Verfahren angewendet zur Bestimmung geringer Mengen von Kalium in Kochsalz; siehe Bd. VI, S. 522.

ββ) Bestimmung durch Oxydation mit Kaliumpermanganat nach W. U. BEHRENS<sup>3</sup>. Das Filtrat des salzsauren Auszuges der Asche (Kaliumoxydgehalt unter 8 mg) wird zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 2 ccm Wasser gelöst; darauf fügt man 1 ccm Natriumnitritlösung (50 g Natriumnitrit auf 100 ccm aufgefüllt) hinzu und läßt unter ständigem Umrühren aus einer Meßpipette schnell 2 ccm Kobaltlösung (15 g Kobaltchlorid und 15 ccm Essigsäure auf 100 ccm aufgefüllt) hinzufließen und rührt noch etwa 1 Minute um. Nach etwa 1/2stündigem Stehen läßt man die bedeckte Schale genau 3 Minuten auf einem gut kochenden Wasserbade stehen, läßt erkalten und filtriert den Niederschlag durch einen Porzellanfildertiegel von 15 ccm Inhalt. Etwaige Reste werden mit Natriumsulfatlösung (2,5%) in den Tiegel gespült und der Niederschlag in diesem dreimal mit 7—8 ccm nachgewaschen.

Währenddessen erwärmt man in einem gut gereinigten 250 ccm-Becherglase im Wasserbade — das nicht kochen darf — ein Gemisch von 70 ccm Wasser, 1—2 ccm Schwefelsäure (50%) und einigen ccm mehr Permanganatlösung, als der zu erwartende Verbrauch beträgt; ein größerer Überschuß an Permanganat darf jedoch nicht vorhanden sein. Darauf gibt man den Tiegel mit dem Niederschlag in das erwärmte, jedoch nicht kochende Gemisch und läßt das Becherglas in dem Wasserbade bis zur völligen Lösung des gelben Niederschlages stehen. Mit einem Teil warmer Permanganatlösung spült man die Porzellenschale aus, um etwaige Reste des Niederschlages zu lösen. Sollte sich die Lösung entfärben, so ist sofort weitere Permanganatlösung zuzugeben. Zu der Permanganatlösung setzt man genau 0,02 N.-Oxalsäurelösung<sup>4</sup> bis zur Entfärbung hinzu und titriert nach Auflösung des etwa gebildeten Braunsteins mit Permanganatlösung bis zur schwachen Rosafärbung. Die Permanganatlösung ist gegen die Oxalsäurelösung einzustellen, indem man erstens 1 ccm ( $x_1$ )

<sup>1</sup> L. DE KONINGK: Zeitschr. analyt. Chem. 1881, 20, 390.

<sup>2</sup> O. LÜNING u. H. HAUTOG: Z. 1925, 49, 1.

<sup>3</sup> W. U. BEHRENS: Zeitschr. Pflanzenernährung und Düngung A. 1932, 24, 289. — Dasselbst finden sich auch weitere Literaturangaben. — Vgl. ferner J. BODNAR u. L. BARTA: Biochem. Zeitschr. 1930, 227, 429. — R. S. HUBBARD: Journ. Biol. Chem. 1933, 100, 557; C. 1933, II, 1724.

<sup>4</sup> Bei Zusatz von 5 Vol.-% konz. Schwefelsäure ist die Oxalsäurelösung monatelang haltbar.

und zweitens 30 ccm ( $x_2$ ) Permanganatlösung nach Zusatz von Wasser und Schwefelsäure genau wie bei der Analyse im nichtsiedenden Wasserbade erwärmt, beide Lösungen mit Oxalsäurelösung im Überschuß entfärbt ( $y_1$  und  $y_2$ ) und mit Permanganatlösung zurücktitriert. Der Umrechnungsfaktor ist dann  $\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$ . Mit diesem Faktor multipliziert man die

bei der Bestimmung verbrauchten Permanganatmengen und von dem so erhaltenen korrigierten Permanganatverbrauch wird das Ergebnis eines Leerversuches mit den Fällungsreagenzien allein abgezogen. Die Differenz  $d$ , mit dem Faktor  $(0,1525 + 0,00035 d)$  multipliziert, ergibt die vorhandenen mg Kaliumoxyd ( $K_2O$ ).

$\gamma\gamma$ ) Colorimetrische Mikrobestimmung. Zur Bestimmung sehr kleiner Mengen (1—1000  $\gamma$  in 1 ccm) Kalium bestimmt man in dem Dikaliumnatriumkobaltinitrit die Salpetrige Säure colorimetrisch. Hierfür verwendet R. A. HERZNER<sup>1</sup> die Reaktion von P. GRIESS<sup>2</sup> mit Sulfanilsäure und  $\alpha$ -Naphthylamin und J. TISCHER<sup>3</sup> die Reaktion von E. RIEGLER<sup>4</sup> mit Natriumnaphthionat und  $\beta$ -Naphthol. Wegen der Einzelheiten der Ausführung der Bestimmung muß auf die Originalarbeiten verwiesen werden.

$\delta$ ) Sonstige Verfahren.  $\alpha\alpha$ ) G. F. SMITH und A. C. SHEAD<sup>5</sup> haben zur Bestimmung des Kaliums neben Natrium eine Kombination der Perchlorat- (S. 1235) und Chloroplatinat-Methode (S. 1234) vorgeschlagen, wobei zunächst die Perchlorate hergestellt werden und dann das Kalium als Chloroplatinat bestimmt wird.

$\beta\beta$ ) H. TOLLERT<sup>6</sup> hat die Bestimmung des Kaliums mit Perrheniumsäure als Kaliumperrenat ( $KReO_4$ ) vorgeschlagen, welches in ähnlicher Weise wie das Kaliumperchlorat dargestellt wird. Das Verfahren besitzt mancherlei Vorzüge, es dürfte aber wegen des hohen Preises der Perrheniumsäure praktisch wohl kaum in Frage kommen.

$\gamma\gamma$ ) FR. MARSHALL<sup>7</sup> fällt das Kalium aus der Lösung der Alkalichloride mit alkoholischer Weinsäurelösung als Kaliumbitartrat.

**g) Natrium.** Man ermittelt den Natriumgehalt einer Substanz in der Regel auf indirektem Wege nach dem S. 1226 angegebenen Verfahren.

Man kann den Natriumgehalt in dem Filtrate der Kaliumbestimmung als Chloroplatinat (S. 1234) auch direkt bestimmen, indem man das Filtrat in einem Porzellantiegel zur Trockne verdampft, den gelinde geglühten Rückstand im Wasserstoffstrom reduziert, das Natriumchlorid mit Wasser auszieht, die Lösung zur Trockne verdampft und den Rückstand nach schwachem Glühen als Natriumchlorid ( $NaCl$ ) zur Wägung bringt.

Man kann auch aus dem Filtrat des Kaliumchloroplatinats den Alkohol verdampfen, den Rückstand mit Wasser aufnehmen, in der wäßrigen Lösung durch Zusatz von etwas Ameisensäure und Erwärmen die Platinchlorwasserstoffsäure zu Platin reduzieren, nach der Filtration die farblose wäßrige Lösung in einer Platinschale zur Trockne verdampfen und den Rückstand nach schwachem Glühen als Natriumchlorid wägen.

Bestimmung nach der Uranylmethode. Das zuerst von A. BLANCHETIÈRE<sup>8</sup> angegebene Verfahren beruht auf der Bildung des Tripelacetates  $3 UO_2(C_2H_3O_2) \cdot Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot NaC_2H_3O_2 \cdot 8 H_2O$ , das einen in Wasser und wäßrigem Alkohol sehr schwer löslichen krystallinen Niederschlag bildet, bei 110° ohne Zersetzung getrocknet werden kann und beim Erhitzen bei beginnender Rotglut in  $MgU_2O_7 \cdot \frac{1}{2} Na_2U_2O_7$  übergeht. Ammonium, Lithium, Calcium und Magnesium stören nach E. KAHANE<sup>9</sup> die Bestimmung nicht, Kalium erst, wenn seine Menge das 10—100fache des Natriums beträgt; Schwermetalle stören erst bei großem Überschuß. Phosphorsäure dagegen stört die Reaktion und muß daher vorher entfernt werden, ebenso nach H. H. BARBER und I. M. KOLTHOFF<sup>10</sup> Oxal- und Weinsäure.

<sup>1</sup> R. A. HERZNER: Biochem. Zeitschr. 1931, 237, 129.

<sup>2</sup> P. GRIESS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1879, 12, 427.

<sup>3</sup> J. TISCHER: Biochem. Zeitschr. 1931, 238, 148.

<sup>4</sup> E. RIEGLER: Zeitschr. analyt. Chem. 1897, 36, 377.

<sup>5</sup> G. F. SMITH und A. C. SHEAD: Journ. Amer. Chem. Soc. 1932, 54, 1722; Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 94, 353.

<sup>6</sup> H. TOLLERT: Zeitschr. anorg. allg. Chem. 1932, 204, 140.

<sup>7</sup> FR. MARSHALL: Chem.-Ztg. 1914, 38, 585.

<sup>8</sup> A. BLANCHETIÈRE: Bull. Soc. Chim. France 1923, [4], 33, 807; C. 1923, IV, 632.

<sup>9</sup> E. KAHANE: Bull. Soc. Chim. France 1930 [4], 47, 382; C. 1930, II, 2675.

<sup>10</sup> H. H. BARBER u. I. M. KOLTHOFF: Journ. Amer. Chem. Soc. 1928, 50, 1625; C. 1928, II, 589.

Nach E. KAHANE<sup>1</sup> bzw. G. B. VAN KAMPEN und L. WESTENBERG<sup>2</sup> verfährt man, wie folgt:

5 g feingemahlene Substanz werden bei nicht zu hoher Temperatur verascht, die Asche mit einigen ccm Salzsäure (25%) und Wasser in einen 100 ccm-Meßkolben übergeführt, einige Minuten gekocht und darauf zur Entfernung der Phosphorsäure so viel gepulvertes reines Calciumoxyd zugesetzt, daß die Flüssigkeit nach 10 Minuten langem Kochen noch deutlich alkalisch reagiert. Man kühlt ab, füllt zur Marke auf und filtriert. Zur Fällung des Kaliums dampft man 15 ccm des Filtrats mit 3 ccm Perchlorsäure in einer Porzellanschale zur Trockne, filtriert vom Kaliumperchlorat ab, wäscht zuerst mit 1% Überchlorsäure enthaltendem, dann mit reinem 96%igen Alkohol aus. Das Filtrat verdünnt man mit Wasser und dampft nach Zusatz von etwas Magnesiumoxyd (zur Einschränkung der Explosionsgefahr) zur Trockne, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf, filtriert, dampft auf 2 ccm ein und fällt das Natrium durch Zusatz von 15 ccm Uranylreagens (32 g kryst. Uranylacetat, 100 g Magnesiumacetat, 20 ccm Eisessig und 500 ccm Alkohol (90%) mit Wasser zu 1 Liter aufgefüllt). Man läßt den Niederschlag über Nacht stehen, filtriert durch einen GOOCH-Tiegel mit Filtrierpapiereinlage und wäscht mit etwa 96%igem Alkohol aus. Der Niederschlag wird 1/2 Stunde bei 105—110° getrocknet und nach dem Erkalten gewogen. 100 mg Tripelacetat entsprechen 1,5 mg Natrium (Na) bzw. 2,07 mg Natriumoxyd (Na<sub>2</sub>O).

F. ALTEN und H. WEILAND<sup>3</sup>, welche das Verfahren bei Kalidüngesalzen angewendet haben, scheiden das Kalium mit Weinsäure ab und verwenden ein alkoholfreies Uranylreagens (50 g Uranylacetat, 162,5 g Magnesiumacetat (wasserfrei), 60 g Eisessig in 1 Liter); sie empfehlen ferner die Verwendung eines Glasfiltertiegels 1 G 3 und Trocknung bei 120°. H. H. BARBER und I. M. KOLTHOFF<sup>4</sup> verwenden statt Magnesiumacetat Zinkacetat und empfehlen das Verfahren namentlich zur Bestimmung kleiner Natriummengen.

M. TISSIER und H. BÉNARD<sup>5</sup> sowie F. ALTEN und H. WEILAND<sup>6</sup> haben eine colorimetrische Mikrobestimmung nach dem Uranylverfahren ausgearbeitet, bei der die Reaktion von Kaliumferrocyanid auf Uransalze zur Anwendung kommt. Nach ALTEN und WEILAND empfiehlt sich das Verfahren namentlich für Natriummengen bis 1 mg in 100 ccm; bei höheren Mengen ist das gewichtsanalytische Verfahren vorzuziehen.

Wiedergewinnung des Urans<sup>7</sup>. Die möglichst alkoholfreie Mutterlauge wird mit Kochsalz verrührt und das ausgefällte Tripelsalz abgesaugt. Es wird in einem geräumigen Kolben mit heißem Wasser aufgeschlämmt, mit viel Ammoniumchlorid und mit Ammoniak im Überschuß versetzt und einige Stunden unter häufigem Umschütteln auf dem Wasserbade belassen. Man läßt dann das Ammoniumuranat absitzen und dekantiert solange mit heißem Wasser, bis sich der Niederschlag nicht mehr klar absetzt, d. h. bis alle Elektrolyte möglichst entfernt sind. Man saugt den Niederschlag möglichst trocken und löst ihn in heißer Essigsäure. Das beim Konzentrieren der Lösung sich abscheidende Uranylacetat wird nochmals aus schwach essigsäurem Wasser umkrystallisiert. Schließlich scheidet sich beim weiteren Konzentrieren Ammonium-Uranylacetat ab, das an seiner Krystallform vom Uranylacetat leicht zu unterscheiden ist. Man scheidet dann aus der Mutterlauge mit Kochsalz das Uranylsalz ab und behandelt es wie oben.

## B. Bestimmung der Säuren.

Die Säuren werden, soweit Bestimmungen in der Asche in Frage kommen, zur Vermeidung von Verlusten zweckmäßig in den nach S. 1220 unter alkalischen Zusätzen hergestellten Aschen bestimmt.

<sup>1</sup> E. KAHANE: Siehe Fußnote 9, S. 1238.

<sup>2</sup> B. G. VAN KAMPEN u. L. WESTENBERG: Chem. Weekbl. 1932, 29, 385; C. 1932, II, 1660.

<sup>3</sup> F. ALTEN u. H. WEILAND; Mitt. Kali-Forsch.-Anstalt Nr. 75, S. 11—16 (1933); C. 1933, II, 2860.

<sup>4</sup> H. H. BARBER u. I. M. KOLTHOFF: Journ. Amer. Chem. Soc. 1928, 50, 1625; C. 1928, II, 589.

<sup>5</sup> M. TISSIER u. H. BÉNARD: Compt. rend. Soc. Biol. 1928, 99, 1144; C. 1928, II, 2582.

<sup>6</sup> F. ALTEN u. H. WEILAND: Zeitschr. Pflanzen-Ernährung A 1933, 31, 252.

<sup>7</sup> F. ALTEN, H. WEILAND u. E. HILLE: Zeitschr. Pflanzen-Ernährung A 1933, 32, 129.



## 1. Chlor.

In der Regel handelt es sich bei der Untersuchung von Lebensmitteln auf Chlorverbindungen um die Bestimmung der Chlorwasserstoffsäure; nur selten kommt auch — z. B. bei der Untersuchung von Konservierungsmitteln — die Bestimmung von Chlorsäure in Frage.

### a) Chlorwasserstoffsäure (HCl).

Die Bestimmung der Chlorwasserstoffsäure nimmt man zweckmäßig nicht in der Asche, sondern nach Möglichkeit in einem Auszuge der Substanz vor.

J. DROST<sup>1</sup> beobachtete in der mit Natriumcarbonatzusatz hergestellten Asche von Milch Verluste an Chlor bis 10,6% und W. v. BRUCHHAUSEN<sup>2</sup> in ebenso hergestellten Aschen von kohlenhydratreichen organischen Stoffen Verluste bis zu 15%.

Zur direkten Chloridbestimmung ohne Veraschung eignet sich insbesondere das Verfahren von E. VOTOČEK. Ist jedoch eine Veraschung nicht zu umgehen, so kann man Chlorverluste vermeiden, indem man die organische Substanz entweder mit Natronlauge und Salpeter aufschließt oder die Veraschung in Gegenwart von alkalischen Zusätzen bei möglichst niedriger Temperatur vornimmt. Die Bestimmung als Silberchlorid kann gewichts- oder maßanalytisch erfolgen; meist erfolgt sie maßanalytisch.

**α) Bestimmung nach FR. MOHR oder J. VOLHARD.** Liegt eine wäßrige Lösung zur Untersuchung vor oder kann man eine solche aus der Substanz leicht herstellen, indem man z. B. 10 g der feingepulverten Substanz in einem 200 ccm-Kolben mit etwa 100 ccm Wasser schüttelt und nach dem Auffüllen filtriert, so titriert man die Lösung bzw. einen aliquoten Teil des Auszuges mit 0,1 N.-Silbernitratlösung in bekannter Weise nach MOHR oder VOLHARD. 1 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung = 3,55 mg Chlor.

**αα)** Nach FR. MOHR. Die Lösung muß neutral sein; sie wird daher nötigenfalls unter Verwendung von Phenolphthalein als Indicator mit Essigsäure oder Salpetersäure bzw. mit Ammoniak oder Natronlauge genau neutralisiert. Zu der neutralen Lösung setzt man einige Tropfen neutraler gesättigter Kaliumchromatlösung hinzu und titriert mit der 0,1 N.-Silbernitratlösung bis zur nach dem Umschütteln bleibenden rötlichen Färbung.

**ββ)** Nach J. VOLHARD. Die Lösung muß salpetersauer sein. Man versetzt die Lösung mit etwa 10 ccm verd. Salpetersäure, fügt einen Überschuß von 0,1 N.-Silbernitratlösung hinzu und erwärmt so lange, bis das Silberchlorid sich zusammengeballt hat. Darauf gibt man 5 ccm einer kaltgesättigten Ferriammoniumsulfatlösung hinzu und titriert den Silberüberschuß mit 0,1 N.-Ammonium- oder Kaliumrhodanidlösung bis zur beginnenden Rotfärbung zurück<sup>3</sup>.

**β) Bestimmung nach E. VOTOČEK<sup>4</sup>.** In der Abänderung von J. GROSSFELD<sup>5</sup> wird das Verfahren, wie folgt, ausgeführt: 10 g des gepulverten Stoffes bringt man in einen 200 ccm-Meßkolben, fügt etwa 0,05—0,1 g Nitroprussidnatrium und 100 ccm einer etwa 1%igen Salpetersäure hinzu und läßt unter häufigem Umschütteln etwa 1 Stunde stehen. Nach dem Auffüllen mit Wasser filtriert man durch ein feinporiges Faltenfilter, worauf man etwas chloridfreie trockene Kieselgur gegeben hat. Von dem völlig klaren Filtrat titriert man 100 ccm mit 0,1 N.-Mercurinitratlösung (10,83 g reines Quecksilberoxyd in verd. Salpetersäure gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt) bis zur eben wahrnehmbaren bleibenden Trübung. 1 ccm 0,1 N.-Mercurinitratlösung = 3,55 mg Chlor. Das Verfahren gestattet die genaue Bestimmung sehr kleiner Chloridmengen.

<sup>1</sup> J. DROST: Z. 1925, 49, 332.    <sup>2</sup> W. v. BRUCHHAUSEN: Z. 1927, 54, 485.

<sup>3</sup> Über die jodometrische Mikrobestimmung des überschüssigen Silbers siehe S. PRIKLA-DOWIZKY u. APOLLONOW: Biochem. Zeitschr. 1928, 200, 135.

<sup>4</sup> E. VOTOČEK: Chem.-Ztg. 1918, 42, 257 u. 270. — Vgl. auch G. ILLARI: Ann. Chim. appl. 1929, 19, 443.

<sup>5</sup> J. GROSSFELD: Z. 1924, 48, 133 und Anleitung zur Untersuchung der Lebensmittel 1927, S. 94.

I. M. KOLTHOFF und A. BAK<sup>1</sup> haben das Verfahren nachgeprüft und angegeben, daß es namentlich bei Anwendung nachfolgender Korrekturen, die sich nach dem Endvolumen der Lösung und der Konzentration des Mercurichlorids richten, sehr genaue Ergebnisse liefert.

| Endvolumen und Konzentration der Mercurichloridlösung | Abzuziehende ccm 0,1 n Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
|---|--|
| 50 ccm 0,050 n bis 100 ccm 0,025 n                    | 0,15—0,20 ccm 0,1 n                                      |
| 100 ccm 0,025 n bis 100 ccm 0,005 n                   | 0,20—0,15 ccm 0,1 n                                      |
| 100 ccm 0,005 n bis 100 ccm 0,001 n                   | 0,15—0,12 ccm 0,1 n                                      |
| 100 ccm 0,001 n bis 100 ccm 0,00025 n                 | 0,12—0,09 ccm 0,1 n                                      |

Salpetersäure und Schwefelsäure stören die Titration nicht; von Metallen stören Kupfer, Kobalt-, Nickel- und Cadmiumsalze.

γ) **Bestimmung nach A. WEITZEL**<sup>2</sup>. Die Substanz wird mit 25% gebranntem Kalk und Wasser zu einem gleichmäßigen Brei angerührt, auf dem Wasserbade getrocknet und dann über einem Pilzbrenner bei möglichst niedriger Temperatur verascht. Die Veraschung verläuft ruhig und gleichmäßig und ist in verhältnismäßig kurzer Zeit beendet. In der Asche kann das Chlor dann in bekannter Weise nach VOLHARD bestimmt werden.

A. D. HUSBAND und W. GODDEN<sup>3</sup> haben das Verfahren nachgeprüft und recht gute Resultate erhalten. — J. BODNÁR und L. BARTA<sup>4</sup> haben ein im wesentlichen auf der gleichen Arbeitsweise beruhendes Mikroverfahren beschrieben.

δ) **Bestimmung nach M. BIRNER**<sup>5</sup>. 2—5 g des frischen oder getrockneten organischen Materials werden mit der zwei- bis dreifachen Menge Natriumhydroxyd in einem hohen und schmalen Nickeltiegel überschichtet und im Wasserbade bis zur völligen Verflüssigung erwärmt. Man erhitzt darauf vorsichtig über freier Flamme und unter Zugabe kleiner Mengen Kaliumnitrat auf etwa 120°, bis völlige Zerstörung eingetreten ist, worauf noch auf kurze Zeit stärker, jedoch nicht über 450° erhitzt wird. Nach Abkühlung und Auflösung der Schmelze in Wasser filtriert man, setzt dem Filtrat einen gemessenen Überschuß von 0,1 N.-Silbernitratlösung hinzu und erhitzt danach 15 Minuten zum Sieden, um die Nitrite zu entfernen; die letzten Spuren davon können durch Zugabe einiger Tropfen Permanganatlösung entfernt werden. Der Überschuß an 0,1 N.-Silbernitratlösung wird nach VOLHARD mit 0,1 N.-Rhodanammonium- oder Rhodankaliumlösung in obiger Weise zurücktitriert.

#### b) Chlorsäure (HClO<sub>3</sub>).

Zum Nachweis und zur Bestimmung führt man die Chlorsäure durch Reduktion mit Schwefliger Säure, Ferrosulfat oder Zink in Chlorwasserstoffsäure über und weist letztere nach bzw. bestimmt sie als Silberchlorid.

Bei Gegenwart von Chloriden versetzt man die salpetersaure Lösung mit einem Überschuß an Silbernitratlösung, filtriert das Silberchlorid ab und reduziert dann die Chlorsäure zu Chlorwasserstoffsäure.

**Reduktion mit Schwefliger Säure.** Die Lösung bzw. das Filtrat wird mit Salpetersäure und einer hinreichenden Menge Natriumsulfatlösung (10%) zum Sieden erhitzt.

**Reduktion mit Ferrosulfatlösung.** Die Lösung bzw. das Filtrat wird mit einer hinreichenden Menge Ferrosulfatlösung (10%) erhitzt und 15 Minuten unter Umrühren im Sieden erhalten, bis sich das ausgeschiedene basische Ferrosulfat gelöst hat.

<sup>1</sup> I. M. KOLTHOFF u. A. BAK: Chem. Weekbl. 1922, 19, 14; C. 1922, II, 1153.

<sup>2</sup> A. WEITZEL: Arb. Reichsgesundh.-Amt 1920, 52, 635.

<sup>3</sup> A. D. HUSBAND u. W. GODDEN: Analyst 1927, 52, 72.

<sup>4</sup> J. BODNÁR u. L. BARTA: Biochem. Zeitschr. 1930, 227, 429.

<sup>5</sup> M. BIRNER: Zeitschr. ges. exp. Medizin 1928, 61, 700; Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 80, 88.

## 2. Jod.

Über die Bestimmung von Jodid in jodierten Speisesalzen siehe Bd. VI, S. 523. Für die Bestimmung der in Lebensmitteln vorkommenden geringen Jodmengen ist eine Reihe von Verfahren<sup>1</sup> empfohlen worden, von denen die brauchbarsten die von TH. v. FELLEBERG, J. SCHWAIBOLD und G. PFEIFFER sind, die in geschlossener Apparatur arbeiten.

a) Verfahren nach TH. v. FELLEBERG<sup>2</sup>. Die Methode ist für Blut beschrieben, kann aber auch bei anderen Materialien mit etwaigen kleinen Abweichungen verwandt werden.

10 ccm Oxalatblut werden mit 1 ccm gesättigter Kaliumcarbonatlösung in einer Nickelschale von 8,5 cm Durchmesser und 2 cm Höhe auf einem Sandbade oder in einem elektrischen Ofen vorsichtig erhitzt. Bläht sich die Substanz auf, so wird sie von Zeit zu Zeit mit einem flachen Glasstöpsel niedergedrückt. Gerät sie an einer Stelle ins Glimmen, so wird die Schale sogleich mit einem Blech bedeckt. Entweichen keine Dämpfe mehr, bedeckt man die Schale mit einer etwas größeren Schale, die man darüber stülpt und bringt sie in einen in einem halbdunkeln Raum befindlichen Muffelofen, der folgendermaßen angeheizt wird: Man erhitzt ihn zuerst auf schwache Rotglut und schraubt dann die Flammen sorgfältig herunter, so daß nach einigen Minuten nur noch an einzelnen Stellen ein ganz leichtes Glühen zu bemerken ist. Man läßt die Schale 10—15 Minuten im Ofen und zieht nun die Kohle unter Absaugen mehrmals mit Wasser etwas aus. Das Filtrat muß farblos oder höchstens hellgelb gefärbt sein. Man dampft es in einem Becherglas aus Jenaer Glas von 200—250 ccm über freier Flamme ein. Unterdessen bringt man die ausgezogene Kohle auf eine kleine Eisen- oder Nickelrinne und verbrennt sie im Rohr in einem gut regulierten Luftstrom, indem man als Vorlage ein 10-Kugel-Rohr benutzt, welches 0,25 ccm gesättigte Kaliumcarbonatlösung und 40 ccm Wasser enthält. Das Verbrennungsrohr (aus Glas oder Quarz; Länge etwa 40 cm, Weite 2,5 cm) hat einen rechtwinklig abgebogenen, 20 cm langen, auf 0,5 mm verjüngten Schenkel. Hinter der Rinne mit der Kohle wird ein auf Rotglut erhitztes, spiralförmig gerolltes Platinblech als Kontakt geschaltet, um die Verbrennung der letzten Reste flüchtiger Stoffe noch besser zu gewährleisten. Ist die Verbrennung beendet, so nimmt man die Rinne mit der Asche aus dem Rohr und zieht die Asche mit Wasser aus. Der Auszug, die bei der Verbrennung vorgelegte Flüssigkeit und das zum Ausspülen des Rohres verwendete Wasser werden zusammen in das Becherglas gegossen, welches bereits den wäßrigen Auszug der Kohle erhalten hatte, und zur Trockne eingedampft. Nun wird das Becherglas in den Muffelofen geschoben und 5 Minuten lang in der beschriebenen Weise erhitzt. Man nimmt es nun mit einer Tiegelszange heraus, welche so angewärmt ist, daß sie Holz gerade bräunt, und läßt es 5 Minuten auf einer Asbestplatte erkalten. Man löst nun den Rückstand im Becherglas in ganz wenig Wasser und dampft wieder ein, so daß ein feuchter Salzbrei bleibt. Diesen extrahiert man 4—5mal unter Verrühren mit einem Glasstabe mit wenig 95%igem Alkohol. Der alkoholische Auszug wird in einem 50 ccm-ERLENMEYER-Kölbchen aus Jenaer Glas in mehreren Portionen eingedampft, der Rückstand mit 1—2 Tropfen gesättigter Kaliumcarbonatlösung versetzt und wieder 5 Minuten lang im Muffelofen erhitzt. Man extrahiert nun noch ein letztes Mal mit Alkohol, indem man den Rückstand zuerst mit etwa 0,5 ccm 85%igem Alkohol aufweicht und dann noch mehrmals mit 95%igem Alkohol auszieht. Diese alkoholische Lösung wird wieder in einem 50-cm-Kölbchen eingedampft, nochmals im Muffelofen erhitzt und ist nun bereit zur Titration. Nach dem Erkalten befeuchtet man den Rückstand mit etwa 0,4 ccm Wasser und gießt nach ungefähr 1 Minute in ein oben abgeschrägtes Jodausschüttelungsröhrchen von 5 mm innerem Durchmesser und 80 mm Höhe. Den in der Schale verbleibenden Rest bestimmt man ein für alle Mal durch Auswägen. Bei einer Platinnormalschale für Weinanalysen von 8 cm Durchmesser bleibt etwa  $\frac{1}{5}$  der Flüssigkeit in der Schale; das Resultat ist also mit  $\frac{5}{4}$  zu multiplizieren. Zu der wäßrigen Lösung gibt man bei 0,1—0,3  $\gamma$  Jod 0,01 ccm Chloroform, bei größeren Mengen 0,02—0,06 ccm, ferner 1 Tröpfchen Nitritschwefelsäure und zerteilt das Chloroform durch 80—100maliges rasches und kräftiges Klopfen an den unteren Teil des fast waagrecht gehaltenen Röhrchens in feine Tröpfchen. Nach dem Zentrifugieren vergleicht man mit Lösungen bekannten Gehalts, die denselben Bedingungen an Konzentration und Chloroform-Wasser-Nitritschwefelsäurequotient entsprechen. Man verwendet Lösungen von 13,7 und 1,37 mg Kaliumjodid im Liter Wasser. Abgemessen wird mit in 0,001 ccm geteilten Pipetten von 0,1 ccm Gesamthalt. Nach der colorimetrischen Bestimmung fügt man zwecks Kontrolle durch Titration 0,5—1 ccm frisches Chlorwasser zur

<sup>1</sup> Ausführliche Literaturangaben finden sich in Zeitschr. analyt. Chem. 1925, 65, 326; 1929, 77, 237; 1931, 84, 68. — Vgl. ferner G. LUNDE, K. CLOSS u. J. BÖE: Mikrochemie 1929, 272.

<sup>2</sup> TH. v. FELLEBERG: Biochem. Zeitschr. 1930, 224, 170 und Mikrochemie 1929, 7, 242.

Lösung, spült in einen 50 ccm-ERLENMEYER-Kolben, setzt einige Siedesteinchen zu und dampft zur Entfernung des Chlors auf 2—3 ccm ein. Der abgekühlte Rückstand wird mit einem Krystall Kaliumjodid und einem Tropfen Stärkelösung versetzt und aus einer in 0,001 ccm geteilten Pipette mit einer 0,002 N.-Thiosulfatlösung titriert. Die Einstellung der Lösung erfolgt jedesmal neu gegen Jodlösung mit entsprechendem Jodgehalt. Die verwendeten Reagenzien müssen auf Jodfreiheit geprüft sein.

**b) Verfahren nach J. SCHWAIBOLD<sup>1</sup>.** Die organische Substanz wird im trockenen Zustand in einem geeigneten Apparat im reinen Sauerstoff verbrannt und etwa entweichendes Jod aufgefangen.

Den Verbrennungsraum bildet eine Röhre von etwa 90 cm Länge und zwischen 20 und 30 mm Durchmesser, deren eines Ende auf etwa 3 mm Durchmesser ausgezogen ist. Das Glas muß sehr schwer schmelzbar sein. In diese Röhre wird ein Porzellan- oder Nickelschiffchen eingebracht, welches die zu untersuchende Substanz enthält; diese muß trocken sein. Flüssigkeiten werden erst am besten im Verbrennungsschiffchen eingetrocknet. Alkalische Flüssigkeiten können ohne weiteres eingetrocknet werden, saure müssen erst mit reiner Kalilauge neutralisiert und schwach alkalisch gemacht werden. Zwischen dem Schiffchen und dem ausgezogenen Ende der Röhre befindet sich ein Platinkontakt. An dieses Röhrende schließen sich zwei gut wirksame Waschflaschen, am besten solche nach GREINER & FRIEDRICHS, Glas an Glas. Diese werden mit einer sehr verdünnten Lösung von jodfreiem Kaliumcarbonat beschickt. Die Konzentration richtet sich nach der zu untersuchenden Substanz. Im allgemeinen genügen 20 bzw. 10 Tropfen einer gesättigten Kaliumcarbonatlösung in der ersten bzw. zweiten der Absorptionsflaschen. Bei Beginn der Verbrennung füllt man die Röhre mit reinem Sauerstoff, bringt den Platinkontakt nach dem Anwärmen des Glases auf Rotglut und erhitzt die Substanz auf der dem Kontakt zugekehrten Seite langsam. Je nach Art der Substanz erfolgt eine spontane Zündung und ein langsames Abbrennen — worauf die noch nicht verbrannten Reste durch Erhitzen völlig oxydiert werden — oder aber die Substanz entzündet sich nicht; dann wird sie durch fortschreitendes Erhitzen allmählich verbrannt. Die Verbrennung unter Gasstrom muß so geleitet werden, daß weder Dämpfe noch Rauch am Ende der Röhre sichtbar werden. Auf diese Weise können mehrere Gramm Trockensubstanz verbrannt werden. Nach beendeter Verbrennung werden die Waschflaschen quantitativ entleert und die Röhre ausgewaschen. Die alkalische Flüssigkeit wird eingedampft, wobei darin zu Beginn auch das Schiffchen ausgekocht wird. Ist das Wasser zum größeren Teil verdampft, so wird filtriert. Die Untersuchung der erhaltenen Lösung, die klar und farblos sein muß, gestaltet sich verschieden je nach der Menge des zu erwartenden Jods. Sind größere Mengen vorhanden, so wird einfach ein aliquoter Teil der Lösung nach L. W. WINKLER<sup>2</sup> titriert. Liegen sehr geringe Mengen vor, so muß die gesamte Lösung eingedampft werden. Aus dem noch feuchten Rückstand wird dann das Jod nach v. FELENBERG, wie oben unter a) beschrieben, mit Alkohol extrahiert und nach dem Vertreiben und Abdestillieren des Alkohols ebenfalls nach WINKLER bestimmt.

**c) Verfahren nach G. PFEIFFER<sup>3</sup>.** Bei diesem Verfahren wird die Substanz mit konz. Schwefelsäure und Wasserstoffsuperoxyd verbrannt.

$\alpha$ ) Die Aufschließungsapparatur (Abb. 7)<sup>4</sup> besteht im wesentlichen aus einem Verbrennungsgefäß *F*<sup>5</sup> (CORLEIGH-Kolben). Der dem weiten Halse *G* des Kolbens eingeschlossene Wasserkühler *H* wird nur als Luftkühler verwendet und dient gleichzeitig zur Aufnahme des Thermometers *T*. An dem Zuführungsrohr ist ein Tropftrichter *J* zur Perhydrolzufuhr eingeschliffen; der im rechten Winkel darunter angesetzte Rohrstützen *K* dient zum Einleiten und Durchspülen des Kolbeninhaltes mit Luft während der Analyse. Tropftrichter und Luftzufuhrstützen münden durch ein gemeinsames, verlängertes Glasrohr auf der Bodenmitte des Kolbens, so daß ein Verspritzen des Aufschlußgutes vermieden, eine gleichmäßige Durchmischung mit Wasserstoffsuperoxyd sowie ein gutes Durchspülen des Kolbeninhaltes mit Luft gewährleistet ist. Die bei der Verbrennung ausströmenden gasförmigen Produkte treten zwischen dem Luftkühler und dem weiten Kolbenhals durch den seitlichen Stützen zur Absorptionsvorlage aus. Zur gleichzeitigen Verbrennung der während des Aufschlusses überdestillierenden Fettsäuren, in besonderen Fällen auch übergehender

<sup>1</sup> J. SCHWAIBOLD: Chem.-Ztg. 1929, 53, 22.

<sup>2</sup> L. W. WINKLER: Zeitschr. angew. Chem. 1916, 29, 342.

<sup>3</sup> G. PFEIFFER: Biochem. Zeitschr. 1928, 195, 128; 201, 298; 1930, 228, 146. — Vgl. auch E. GLIMM u. J. ISENBRUCH: Biochem. Zeitschr. 1929, 207, 368.

<sup>4</sup> Die vollständige Apparatur wird von der Firma H. Geissler Nachfolger in Bonn geliefert.

<sup>5</sup> Bei Anwendung von 20 g Substanz und mehr muß das Aufschließungsgefäß *F* 1,5 bis 2 Liter fassen.

aromatischer Verbindungen, wird zwischen das Verbrennungsgefäß *F* und die Absorptionsvorlagen *D*<sub>1</sub> und *D*<sub>2</sub> ein auf Rotglut erhitztes Quarzrohr *ABC* mit einliegendem Platinkontakt geschaltet. Die lichte Weite des Quarzrohres kann bei kleineren Substanzmengen mit etwa 7—8 mm gewählt werden; bei 20 g und mehr beträgt sie zweckmäßig etwa 15 mm. Dadurch wird die Durchströmungsgeschwindigkeit um ein Mehrfaches reduziert und die Verbrennungsgelegenheit der Gase gesteigert. Der senkrecht laufende Rohrschenkel *BC* ist etwa 12 cm lang; die heißen Verbrennungsgase durchlaufen dadurch, nach Passieren der Glühstelle zwischen *A* und *B*, eine Rohrlänge von etwa 24 cm, bis sie das Eintrittsrohr der ersten Absorptionsflasche *D*<sub>1</sub> erreichen. Auf dieser Strecke geht eine genügende Abkühlung der Gase vor sich, so daß die Verbindung Quarz auf Glas bei *E* durch ein kurzes Schlauchstück gehalten werden kann. Um stets ein leichtes Umschwenken des Verbrennungsgefäßes *F* durchführen zu können, ist unter der Schlauchverbindung zwischen Gasaustrittsstutzen und Quarzrohr bei *A* 1—2 mm Spielraum zu lassen. Als Platinkontakt ist ein 8 cm langer,

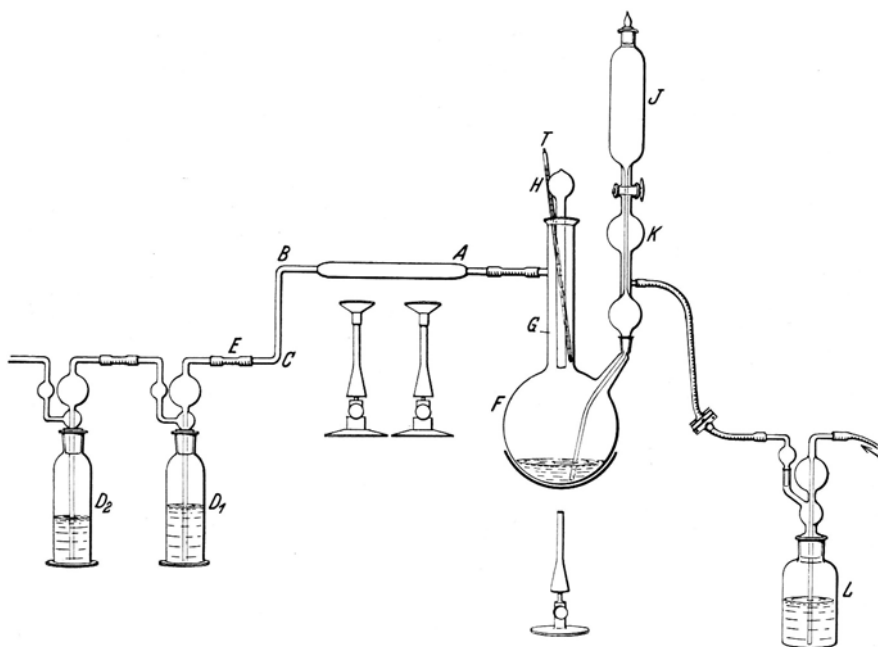


Abb. 7. Aufschließungsapparat für Jodbestimmung nach PFEIFFER.

leicht schraubenförmig gedrehter Platinstern oder eine Platindrahtspirale in die Mitte des waagrecht verlaufenden Quarzrohrteiles *AB* eingeschoben. Die Erhitzung des Rohres daselbst auf Rotglut geschieht durch zwei Teclu-Brenner mit Spaltaufsätzen oder auch durch ein 14 cm langes elektrisch geheiztes Mantelöfchen. Das Quarzrohr muß vor Beginn des Aufschlusses auf seine Temperatur gebracht werden, da sich manchmal bereits während des Einfüllens der Schwefelsäure in den Verbrennungskolben Spuren organischer Verbindungen verflüchtigen und nach den Absorptionsvorlagen zu austreten.

β) Verbrennung. Zur Analyse wird eine abgewogene Menge der zerkleinerten und gemahlene Substanz nach Herausnehmen des Luftkühlers *H* und Einsetzen eines weiten Trichters mit bis zur Kolbenmitte reichendem Ansatzrohr mit wenig Wasser in das Verbrennungsgefäß *F* befördert. Darauf wird die Gesamtapparatur miteinander verbunden und man beginnt mit der Zugabe kleinerer Schwefelsäuremengen vom seitlichen Ansatztrichter *J* aus. Der Gesamteinhalt des Kolbens wird zwecks langsamer Einwirkung der Säure auf die Substanz jeweils vorsichtig umgeschwenkt. Erst dann wird die Hauptmenge der Schwefelsäure, ebenfalls in Teilmengen, zugefüllt. Die Reaktionstemperatur der Aufschlußsäure, die über 200° liegen soll, erreicht man bei einem 1-Liter-Gefäß (Inhalt z. B. 10 g Trockensubstanz in 150 ccm Schwefelsäure) in 3—4 Minuten durch volle Erhitzung mit einem Teclu-Brenner. Dabei ist berücksichtigt, daß der Kolben in einer 2 mm starken, passenden Asbestschale ruht, die noch in einem gleichgeformten Asbestdrahtnetz gestützt liegt. Ein gleichmäßiger Luftstrom, dessen Blasen zählbar sind, passiert während dieser

Zeit die Apparatur von *L* aus. Zu Beginn der einsetzenden Verbrennung reduziert man den Luftstrom auf ein Minimum, die Flammengröße unter dem Verbrennungsgefäß auf ein Viertel bis ein Fünftel der anfänglichen Stärke und läßt kontinuierlich Wasserstoffsperoxyd (30%) von *J* aus zutropfen. Die Verbrennungsgase passieren das glühende Quarzrohr *AB*, in dem nun die Reste mitgerissener organischer Verbindungen verbrannt werden, und treten in die hintereinander geschalteten Absorptionsvorlagen *D*<sub>1</sub> und *D*<sub>2</sub>. Wird der in die Vorlagen austretende Gasstrom zu lebhaft, dann muß die Wasserstoffsperoxydzufuhr verlangsamt werden; sie darf aber auch nicht zu sehr gedrosselt werden, da sonst die Bildung von Schwefliger Säure im Verbrennungsgefäß überhandnimmt. Einen Anhaltspunkt für letzteren Vorgang hat man in dem Auftreten von Kohlensäureentwicklung in der ersten Absorptionsflasche. In diesem außergewöhnlichen Falle entfernt man für einige Zeit die Flamme ganz und steigert die Wasserstoffsperoxydzugabe. Dadurch werden wieder normale Verhältnisse erreicht, und die Verbrennung kann wie oben begonnen und unter Ausschaltung von Reduktionsprozessen, wie früher beschrieben, zu Ende geführt werden.

γ) Absorption der jodhaltigen Verbrennungsgase. Zur Absorption der jodhaltigen Verbrennungsgase werden die Vorlageflaschen *D*<sub>1</sub> und *D*<sub>2</sub> mit Kaliumcarbonatlösung beschickt. Für 10 g Trockensubstanz genügen als erste Vorlage 5 ccm gesättigte Kaliumcarbonatlösung zu einem entsprechenden Volumen Wasser, als zweite Vorlage 1—2 ccm in Wasser. Es empfiehlt sich, den Salzgehalt der Vorlagen auf ein Mindestmaß zu halten, um dadurch die Alkoholextraktion zu erleichtern. Durch die Verwendung von Kaliumcarbonatlösung anstatt Kalilauge erübrigt sich eine unter Umständen nötige Reduktion von Jodsauerstoffverbindungen.

δ) Bestimmung des Jods in der Absorptionsflüssigkeit. Hat man keinen Anhalt über die in der Absorptionsflüssigkeit enthaltene Jodmenge, so wird zunächst der Inhalt der Vorlageflaschen, der farblos sein muß, samt Waschwasser in einem Meßzylinder vereinigt, gemischt und sein Volumen bestimmt. Die Flüssigkeitsmenge schwankt gewöhnlich zwischen 150—200 ccm, denn sie ergibt sich aus der angewandten Substanz bzw. aus dem vorgeschalteten, kaliumcarbonathaltigen Wasservolumen. Je schmaler die Absorptionsflaschen in ihrer Form gewählt werden — 6 cm Flüssigkeitshöhe in jeder Flasche genügen —, um so geringer wird das zu verarbeitende Endvolumen. Dann wird qualitativ der annähernde Jodgehalt in einigen ccm Flüssigkeit in bekannter Weise nach dem Ansäuern colorimetrisch ermittelt. Sind dabei erkennbare Jodmengen festgestellt worden, so kann die sofortige quantitative Bestimmung des Jods in der Gesamtflüssigkeit folgen.

Die unmittelbare Jodtitration in der Gesamtflüssigkeit wird nach WINKLER in folgender Weise vorgenommen: Aliquote Teile, z. B. je 10 ccm, werden in 50 ccm fassende oder kleinere ERLÉNMEYER-Kölbchen pipettiert, mit so viel frisch bereitetem Chlorwasser versetzt, bis die Flüssigkeit stark nach Chlor riecht, und mit Salzsäure (1:1) angesäuert. Die Flüssigkeit nimmt damit eine gelbe Farbe an; sie wird nach Zugabe von ein bis zwei ausgeglühten Tonscherbchen 3—4 Minuten in lebhaftem Sieden gehalten. Nach dem Abkühlen setzt man einige Tropfen 0,2%ige Stärkelösung und ein Körnchen Kaliumjodid hinzu und titriert das frei gewordene Jod mit 0,002—0,0001 N.-Thiosulfatlösung aus der Mikrobürette. Die Titerstellung der Thiosulfatlösung hat täglich neu zu erfolgen. Zur Einstellung verwendet man bestimmte Anteile einer Kaliumjodid-Urlösung (13,08 mg Kaliumjodid = 10 mg Jod in 100 ccm).

Hat der qualitative Jodnachweis in der Gesamtflüssigkeit keine direkt nachweisbaren Mengen Jod erkennen lassen, so wird die gesamte oder geteilte Flüssigkeit in einer tiefen 250 ccm fassenden Porzellanschale eingedampft und auf einer Asbestschale mit einem Pilzbrenner unter Umrühren eingetrocknet. Den Salzurückstand, der rein weiß sein muß, zerreibt man in der Schale mit einem Pistill und befeuchtet ihn mit so viel Tropfen Wasser, daß eine langsam fließende Masse entsteht. Bei den folgenden wiederholten Alkoholextraktionen darf die Salzmasse nicht zu plastisch werden, sondern sie soll während des Umrührens stets langsam von der Schalenwand abfließen. Nötigenfalls wird etwas gesättigte Kaliumcarbonatlösung zugesetzt. Die abgegossenen Alkoholauszüge werden in einer Porzellanschale vereinigt, mit dem gleichen Volumen Wasser und 1—2 Tropfen Kaliumcarbonatlösung versetzt und eingedampft. Der Abdampfdruckstand ist nur dann durch Spuren organischer Beimengungen verfärbt, wenn solche bei zu lebhaftem Verbrennungsprozeß der Zusatzverbrennung entgangen sind. Es bleibt in diesem Falle nur ein vorsichtiges Verglühen des Rückstandes in einer Platinschale übrig. Der rein weiße Salzurückstand wird, wenn er zu groß erscheint, ein zweites Mal extrahiert und kann nun zur colorimetrischen und titrimetrischen Bestimmung benutzt werden.

### 3. Fluor.

Fluor kommt in geringen Mengen in vielen pflanzlichen und tierischen Substanzen vor. Da Ammonium- und Alkalifluoride als Konservierungsmittel

für Lebensmittel Verwendung finden, kommt ferner der Nachweis und die Bestimmung von Fluoriden in Frage. Silicofluoride finden auch als Ungeziefervertilgungsmittel Verwendung.

### a) Fluorwasserstoffsäure (HF).

**Nachweis.**  $\alpha$ ) Das allgemeinste Verfahren zum Nachweise von Fluoriden ist das Ätzverfahren (S. 1426).

$\beta$ ) Verfahren von R. J. MEYER und W. SCHULZ<sup>1</sup>. Man dampft die zu untersuchende schwach alkalische Lösung auf etwa 10 ccm ein, säuert sie mit Essigsäure stark an, setzt in der Kälte einen Überschuß von Lanthanacetatlösung (1%) und dann reichlich festes Ammoniumacetat hinzu und kocht auf. Bei Gegenwart von Fluor scheidet sich ein zuerst flockiger, nach einigem Stehen oder Erwärmen feinkörnig werdender Niederschlag von Lanthanfluoridacetat ab. Empfindlichkeitsgrenze bei mehrstündigem Stehen 0,01 mg.

$\gamma$ ) J. H. DE BOER<sup>2</sup> gibt eine Farbenreaktion mit Zirkonsalzen und Alizarinsulfosäure an.

**Bestimmung.** Für die Bestimmung der löslichen Fluoride in Konservierungsmitteln erscheint neben der Bestimmung als Calciumfluorid auch das Verfahren von MEYER und SCHULZ geeignet. Für die Bestimmung von solchen Konservierungsmitteln in Lebensmitteln eignet sich namentlich das Verfahren von O. NOETZEL und für die der geringen in pflanzlichen und tierischen Stoffen vorkommenden Fluormengen das colorimetrische Verfahren von A. GAUTIER und P. CLAUSMAN.

$\alpha$ ) Bestimmung als Calciumfluorid<sup>3</sup>. Liegt freie Fluorwasserstoffsäure oder eine Lösung eines sauren Fluorides vor, so setzt man Natriumcarbonatlösung bis zur alkalischen Reaktion hinzu und dann noch 20—25% mehr, als zur Neutralisation erforderlich war. Bei neutralen Fluoriden setzt man etwa 1 ccm 2 N.-Natriumcarbonatlösung hinzu. Die zum Sieden erhitzte alkalische Lösung fällt man mit einem Überschuß von Calciumchloridlösung, filtriert und wäscht mit heißem Wasser aus. Den aus Calciumfluorid und -carbonat bestehenden getrockneten Niederschlag glüht<sup>4</sup> man im Platintiegel, löst den Rückstand mit verd. Essigsäure in geringem Überschuß und verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne. Die trockne Masse nimmt man mit Wasser auf, filtriert, wäscht das Unlösliche aus, glüht es nach dem Trocknen schwach im Platintiegel und wägt als Calciumfluorid. Calciumfluorid  $\times$  0,4867 = Fluor (F).

Da bei Wasserbadtemperatur 100 ccm Wasser 1,6 mg und 100 ccm 1,5 N.-Essigsäure 11,1 mg Calciumfluorid lösen, fällt die Bestimmung etwas zu niedrig aus.

$\beta$ ) Bestimmung nach R. J. MEYER und W. SCHULZ<sup>1</sup>. Das oben beschriebene Nachweisverfahren mit Lanthanacetat eignet sich auch zur Bestimmung wasserlöslicher Fluoride, da das Lanthanfluoridacetat eine konstante, bei 180° beständige Zusammensetzung besitzt.

Man fällt die Fluoridlösung in einer Glasschale wie oben mit Lanthanacetatlösung. Nach dem Aufkochen läßt man absitzen, filtriert die überstehende klare Flüssigkeit durch einen GOOCH-Tiegel, dampft darauf den in der Glasschale<sup>5</sup>

<sup>1</sup> R. J. MEYER u. W. SCHULZ: Zeitschr. angew. Chem. 1925, **38**, 203; Z. 1925, **50**, 440.

<sup>2</sup> J. H. DE BOER: Chem. Weekbl. 1924, **21**, 404; C. 1925, **I**, 133. — Vgl. auch H. LÜHRIG: Pharm. Zentralh. 1926, **67**, 513.

<sup>3</sup> W. D. TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, Bd. II, 11. Aufl., S. 401, 1930.

<sup>4</sup> Bei größerem Niederschlag verascht man zunächst das Filter und gibt dann die Hauptmenge des Niederschlages hinzu.

<sup>5</sup> Die Verfasser empfehlen die Verwendung einer dunkelglasierten Porzellanschale.

verbliebenen Rückstand auf dem Wasserbade ein und trocknet ihn bei etwa 150°. Darauf kocht man ihn mit essigsauerm, ammoniumacetathaltigem, heißem Wasser auf und dekantiert mehrere Male mit heißem essigsauerm Wasser, filtriert schließlich durch den GOOCH-Tiegel und wäscht mit essigsauerm Wasser bis zum Verschwinden der Ammoniumreaktion aus. Der Niederschlag wird alsdann bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Dann wird der Tiegel schwach geglüht, bis der Inhalt nach vorübergehender Dunkel-färbung infolge Zersetzung des Lanthanacetats wieder rein weiß geworden ist. Man wiederholt das Glühen des Rückstandes während je 4—5 Minuten bis zur Gewichtskonstanz und wägt ihn als  $\text{LaF}_3 + \text{La}_2\text{O}_3$ .

Ist  $a$  die angewandte Substanz,  $b$  die gewogene Menge  $\text{LaF}_3 + \text{La}_2\text{O}_3$ ,  $c$  der Gewichtsverlust beim Glühen, so ist

$$\% \text{ F} = \frac{57 (b - 1,0647 c) \times 100}{195,9 a}$$

Das Verfahren gestattet die Bestimmung weniger mg Fluor.

γ) Bestimmung nach O. NOETZEL<sup>1</sup>. Sie beruht auf der Titration des Fluors mit Ferrichlorid nach A. GREEF<sup>2</sup>:



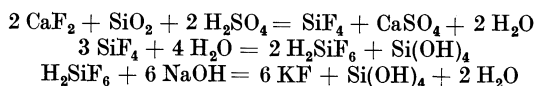
Das Natriumferrifluorid ist bei Gegenwart von Natriumchlorid, Alkohol und Äther unlöslich. Ein Überschuß von Ferrichlorid wird durch Ammoniumrhodanid angezeigt. Die Titration geschieht in folgender Weise:

Erforderliche Lösungen. 1. Fluoridlösung: Eine Lösung von 5,530 g reinem Natriumfluorid, gegen Phenolphthalein genau neutralisiert, wird auf 500 ccm aufgefüllt; 20 ccm davon entsprechen 0,1 g Fluor.

2. Ferrichloridlösung: Eine Ferrichloridlösung, von der etwa 10 ccm 0,1 g Fluor entsprechen (18—20 ccm der officinellen Lösung zu 500 ccm). Die Lösung ist im Dunkeln aufzubewahren.

Zur Titerstellung gibt man etwa 20 ccm der Lösung 1 = 0,1 g Fluor in ein 100 ccm-ERLENMEYER-Kölbchen, fügt etwa 12—15 g Natriumchlorid und 5 ccm Ammoniumrhodanidlösung (10%) hinzu und titriert mit der Ferrichloridlösung bis zur eben sichtbaren Gelbfärbung. Nach Zugabe von etwa 20 ccm eines Gemisches gleicher Teile Alkohol und Äther titriert man unter lebhaftem Umschütteln bei Verschuß des Kölbchens mit einem Pfropfen bis zur bleibenden Rosafärbung mit der Ferrichloridlösung. Da die Entfärbung gegen Ende der Reaktion etwas langsamer vor sich geht, muß man zum Schluß noch 1 Minute kräftig schütteln und beobachten, ob die Rosafärbung bestehen bleibt. Bei ruhigem Stehen muß sich dann eine fleischrot gefärbte, längere Zeit hindurch bestehende Ätherschicht absetzen. Ungelöstes Natriumchlorid muß noch vorhanden sein. Zweckmäßig werden alle Bestimmungen im gleichen Flüssigkeitsvolumen von 20—25 ccm ausgeführt und auf gleichen Farbton eingestellt.

Würde man in dieser Weise den Fluoridgehalt von Aschen titrieren, so würde darin vorhandene Phosphorsäure stören und unlösliche Fluoride würden nicht zur Bestimmung kommen. Man treibt daher das Fluor der Fluoride aus der Asche unter Zusatz von Kieselsäure mit konz. Schwefelsäure als Silicofluorwasserstoffsäure in Natronlauge und bestimmt die sich dabei nach den Gleichungen



bildende Fluorwasserstoffsäure in der obigen Weise.

<sup>1</sup> O. NOETZEL: Z. 1925, 49, 31.

<sup>2</sup> A. GREEF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1913, 46, 2511.



Die Apparatur (Abb. 8) besteht aus einem 200 ccm-Rundkolben *A*, dessen Öffnung durch einen doppelt durchbohrten Kautschukstopfen verschlossen werden kann. Durch die eine Bohrung wird ein Scheidetrichter *B* von 50 ccm Inhalt bis fast auf den Boden, durch die andere ein Verbindungsrohr nach der Vorlage *C* geführt. Der Scheidetrichter steht oben mit einem Lufttrockenapparat in Verbindung, der sich aus einer Waschflasche *D* mit Schwefelsäure und einem Calciumchloridrohr *E* zusammensetzt. Die Vorlage *C* besteht aus zwei ERLLENMEYER-Kölbchen (*I* und *II*) zu je 100 ccm und einem solchen zu 50 ccm (*III*). Das Glasrohr im Kölbchen *I* muß ziemlich weit sein und ist dicht unterhalb des Stopfens durchgeschnitten und mittels Gummischlauchs wieder verbunden, damit es zwecks leichterer Reinigung abgenommen werden kann. Die Kölbchen sind an einem Holzständer befestigt. Das Kölbchen *III* ist mit einer Wasserluftpumpe verbunden. In das Kölbchen *I* werden etwa 10 ccm Natronlauge (4%), in das Kölbchen *II* 2 ccm davon und 8 ccm Wasser, in das Kölbchen *III* noch etwa 10 ccm Wasser, einige Tropfen der Natronlauge und einige Tropfen Phenolphthaleinlösung gebracht.

Ausführung der Bestimmung. 50–100 g Substanz werden nach dem Vermischen mit 1–2 g frisch gebranntem und zu Brei zerriebenem Kalk eingetrocknet und verascht. Die Asche wird nach sorgfältiger Entfernung aus der

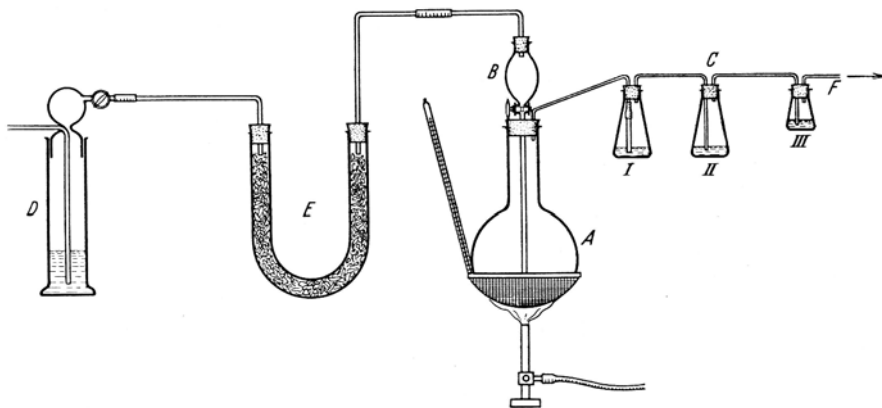


Abb. 8. Apparatur zur Fluorbestimmung nach NOETZEL.

Schale in einem Achatmörser sehr fein zerrieben und mit etwa 5–7 g fein gemahlenem Quarzsand vermischt.

Vor Beginn der Bestimmung werden alle Glassachen, Gummipropfen und Schläuche, mit Ausnahme der ERLLENMEYER-Kölbchen *I*, *II*, *III*, bei 100° getrocknet. Die zu verwendende Schwefelsäure muß möglichst wasserfrei sein; sie ist vor dem Gebrauche bis zur Entwicklung weißer Dämpfe zu erhitzen und im Schwefelsäureexsiccator aufzubewahren. Nach Zusammensetzung der Apparatur wird die Asche in den Glaskolben *A* gebracht, der in einem Sandbade steht, und 40 ccm der Schwefelsäure in den Scheidetrichter gebracht. Nachdem dieser mit dem Lufttrockenapparat verbunden und die Vorlage angeschlossen ist, läßt man langsam die Schwefelsäure in den Kolben tropfen. Dabei wird der Zulauf so geregelt, daß die Reaktion nicht zu stürmisch verläuft. Ist alle Schwefelsäure zugegeben, so schüttelt man zuerst vorsichtig, dann wiederholt stärker um und erhitzt allmählich bis auf etwa 180°. Ist die Gasentwicklung fast zu Ende, so saugt man mit einer Wasserstrahlpumpe bei *F* zuerst langsam, dann gegen Ende der Reaktion schneller Luft durch den Apparat. Zeigen sich auf der Oberfläche der Schwefelsäure keine Gasbläschen mehr, so ist die Ausreibung des Fluorsiliciums beendet, was in etwa 5 Stunden erreicht wird. Dann wird der Apparat auseinandergenommen, wobei zu beachten ist, daß die Flüssigkeit der Vorlage *I* nicht in die Schwefelsäure in *A* zurücksteigt. Darauf wird der Inhalt von Kölbchen *II* zu dem von Kölbchen *I* gegeben. Kölbchen *III*,

das höchstens Spuren von Fluor enthält, wird für sich titriert. Sämtliche Glasröhrchen werden mit Wasser ausgespült. Die vereinigten Flüssigkeiten werden aufgeköcht, das Zuleitungsrohr zu Kölbchen *I*, das stets Ablagerungen von Kieselsäure und Kieselfluornatrium enthält, wird abgenommen und mittels Glasstabs und Gummiwischers quantitativ gereinigt.

Die Lösung wird in der Hitze gegen Phenolphthalein neutralisiert. Man setzt zu diesem Zwecke tropfenweise zuerst stärkere, dann normale Salzsäure hinzu und kocht nach jedem Zusatze auf, bis keine Rotfärbung mehr entsteht. Ein großer Überschuß an Salzsäure beim Kochen ist zu vermeiden. Die heiße blaßrosa Lösung wird durch Eindampfen im Kölbchen auf 25 cm gebracht und wie oben beschrieben mit Ferrichlorid titriert. Bei größerem Fluorgehalt, der durch die Menge der ausgeschiedenen Kieselsäure erkennbar ist, füllt man auf 50 cm auf und titriert von dieser Lösung 25 cm.

Die Titration von Fluormengen unter 0,025 g ist bei Verwendung der obigen Ferrichloridlösung nicht mehr genau. In solchen Fällen empfiehlt sich entweder ein genau gewogener Zusatz von etwa 0,1 g Fluor, der von dem Titrationsergebnis wieder abgezogen wird, oder die Verwendung einer entsprechend verdünnteren Ferrichloridlösung.

δ) Colorimetrische Bestimmung nach A. GAUTIER und P. CLAUSMANN<sup>1</sup>. Die Methode beruht darauf, daß unlösliche Calcium-, Barium- und Magnesiumverbindungen beim Fällen in neutraler oder schwach alkalischer Lösung die Fluorverbindungen mitreißen. Es wird daher zuerst eine Anreicherung des Fluors im Bariumsulfatniederschlage vorgenommen, dann das Fluor in Alkaliverbindungen übergeführt, woraus es frei gemacht wird und als Bleifluorid colorimetrisch bestimmt wird. Zur Ausführung der Bestimmung werden pflanzliche und tierische Gewebe mit 2% frisch gelöschtem pulverförmigem Calciumoxyd vermischt und bei Rotglut im Muffelofen geglüht. Man nimmt mit verd. Schwefelsäure auf, neutralisiert, ohne zu filtrieren, versetzt mit Natriumsulfat und fällt mit Bariumchlorid, dampft zur Trockne, wäscht unter Zentrifugieren mit stark verd. Alkohol von 65° aus und erhitzt den Rückstand in einem hermetisch verschlossenen Goldtiegel (Abb. 9) mit reiner konz. Schwefelsäure. In dem Goldtiegel befindet sich ein zum Umkippen geeignetes kleines Gefäß mit Schwefelsäure und, unter dem Deckel hängend, ein Behälter mit einigen Stückchen mit Wasser befeuchteten Kaliumhydroxyds. Der Deckel ist nach innen zu gewölbt und wird von außen durch einen aufgesetzten Metallkühler mit Wasser gekühlt. Nachdem der Deckel aufgeschraubt ist, läßt man das Schwefelsäuregefäß durch einen Stoß umkippen und erhitzt den Tiegel 2 Stunden lang auf 180—185° auf einem Bronzeblock. Das beim Glühen im Goldtiegel entstandene Kaliumfluorid, gemischt mit etwas Flüssigkeit und Chlorid, wird mit Wasser aufgenommen; bei sehr kieselsäurereichem Material wird die Lösung zur Zerstörung des Silicofluorids aufgeköcht, neutralisiert und die Kieselsäure durch Zusatz von Ammoniumchlorid und Ammoniumcarbonat gefällt. Das Filtrat wird nochmals mit Natriumsulfat und Bariumnitrat gefällt, der Trockenrückstand mit verd. Alkohol salz- und salpetersäurefrei gewaschen und getrocknet. Man bringt ihn dann in einen Platintiegel, der genau so eingerichtet ist, wie der oben beschriebene Goldtiegel, der jedoch in dem Körbchen unter dem Deckel statt Kalilauge gepulvertes und angefeuchtetes Flintglas enthält. Man erhitzt nach Zusatz von Schwefelsäure

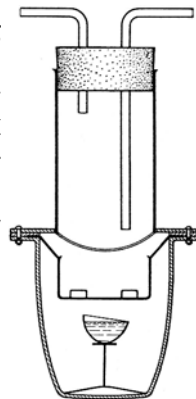


Abb. 9. Tiegel zur Fluorbestimmung nach GAUTIER und CLAUSMANN.

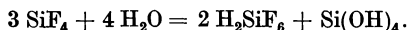
<sup>1</sup> A. GAUTIER u. P. CLAUSMANN: Compt. rend. Paris 1912, 154, 1670 u. 1753 u. Ann. des Falsific. 1912, 5, 329; Z. 1913, 26, 313; 1916, 32, 343.

4 Stunden auf 180°, behandelt den Inhalt des Körbchens mit Kaliumchlorat auf dem Wasserbade, wobei das gebildete Bleifluorid in Lösung geht, während das Flintglas nicht angegriffen wird. Man bringt die Lösung auf 20 ccm, setzt 2 Tropfen Gelatinelösung zu und leitet Schwefelwasserstoff ein. Das Bleisulfid fällt kolloidal aus und wird mit einer gleich behandelten Bleinitratlösung colorimetrisch verglichen. Durch Division mit 2,5 — bei einer gefundenen Bleimenge von 2—6 mg — erhält man die entsprechende Fluormenge.

e) Sonstige Verfahren. Außer den vorstehenden Bestimmungsverfahren ist auch noch von FRESENIUS (FRESENIUS: Quantitative Analyse 1, 431), sowie von S. PENFIELD (Chem. News 39, 179), ferner von W. SCHMITZ-DUMONT (Tharandter forstl. Jahrbücher 1896, 46, 50), von W. HEMPEL und W. SCHEFFLER (Zeitschr. anorg. Chem. 1899, 20, 1), von F. P. TREADWELL und A. A. KOCH (Zeitschr. analyt. Chem. 1904, 43, 469) und von H. SERTZ (Zeitschr. analyt. Chem. 1921, 60, 321) die Bestimmung als Fluorsilicium (SiF<sub>4</sub>) bzw. als Silicofluorwasserstoffsäure (H<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>) vorgeschlagen. Ferner haben E. RAMANN und GRAF ZU LEININGEN (Inaugural-Dissertation des letzteren München 1904) sowie G. SONNTAG (Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1916, 50, 307) die Bestimmung geringer Fluormengen in tierischen und pflanzlichen Stoffen aus dem Gewichtsverlust bei der Glasätzung vorgeschlagen.

### b) Silicofluorwasserstoffsäure (H<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>).

Die Säure bildet sich bei der Einwirkung von Fluorsilicium auf Wasser unter Abscheidung von Kieselsäure:



Die meisten Silicofluoride sind in Wasser löslich; nur das Kalium- und Bariumsalz sind darin schwer und in 50%igem Alkohol unlöslich. — Konz. Schwefelsäure zersetzt alle Silicofluoride unter Bildung von Fluorsilicium und Fluorwasserstoffsäure:



**Nachweis.** α) Kaliumchlorid erzeugt in nicht zu verdünnten Lösungen eine gallertige Fällung von Kaliumsilicofluorid, das in Wasser schwer löslich, noch schwerer in Kaliumchloridlösung und unlöslich in 50%igem Alkohol ist; dagegen ist der Niederschlag leicht in Ammoniumchlorid löslich.

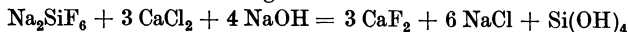
β) Ammoniak und Alkalilauge zersetzen Silicofluoride zu Fluoriden unter Abscheidung von Kieselsäure; mit Alkalien geht ein Teil der letzteren in wasserlösliche Alkalisilicate über.

γ) Enthält die Lösung keine Fluoride, so können die nach β) gebildeten Fluoride nach S. 1246 nachgewiesen werden.

**Bestimmung.** α) Enthält die Lösung keine Fluorwasserstoffsäure, so kann die Silicofluorwasserstoffsäure nach dem unter a), γ) (S. 1247) angegebenen Verfahren durch Titration mit Ferrichlorid direkt bestimmt werden, oder man führt sie durch Erwärmen mit Natriumcarbonatlösung in Fluoride über und bestimmt diese nach S. 1246 als Calciumfluorid oder als Lanthanfluoridacetat.

β) Enthält die Lösung gleichzeitig Fluoride, so kann die Bestimmung der Silicofluorwasserstoffsäure vielleicht in der Weise erfolgen, daß man in einem Teile der essigsauren Lösung die Fluorwasserstoffsäure mit Lanthanacetat nach S. 1246 bestimmt und in einem zweiten Teile der Lösung zunächst durch Erwärmen mit Natriumcarbonat die Silicofluorwasserstoffsäure in Fluorwasserstoffsäure überführt und dann ebenfalls mit Lanthanacetat fällt. Die Differenz beider Bestimmungen würde dann dem Gehalt an Silicofluorwasserstoff entsprechen.

γ) In Alkalisilicofluoriden kann der Gehalt an Silicofluorid nach Zusatz eines Überschusses von neutraler Calciumchloridlösung durch Titration mit Natronlauge und Phenolphthalein im Sinne der Gleichung



bestimmt werden<sup>1</sup>.

1 ccm 0,1 N.-Natronlauge = 47,08 mg Natriumsilicofluorid (Na<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>).

<sup>1</sup> L. SCHUCHT u. W. MÖLLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 3693.

#### 4. Schwefelsäure.

Schwefelverbindungen kommen in Lebensmitteln teils in Form von Sulfaten, teils in organischer Bindung als Proteine usw. vor, die bei der Veraschung zu Sulfaten oxydiert werden. Aufgabe der Untersuchung kann es daher sein, den Gesamt-Schwefel oder die natürlich vorhandene Schwefelsäure zu bestimmen.

Für die Bestimmung der natürlich vorhandenen Schwefelsäure zieht man die natürliche Substanz erschöpfend mit verd. Salzsäure aus und bestimmt in der klaren, nötigenfalls vorher geklärten Lösung die Schwefelsäure nach einem der nachstehend unter b) beschriebenen Verfahren.

a) **Bestimmung des Gesamt-Schwefels.**  $\alpha$ ) Direkte Bestimmung durch Oxydation. Hierzu können die S. 585 angegebenen Verfahren und ferner auch das Verfahren von A. KONARSKY<sup>1</sup> dienen.

$\beta$ ) Bestimmung durch Veraschung. Der Gesamt-Schwefel kann auch durch Veraschung und Bestimmung der dabei gebildeten Sulfate bestimmt werden. Hierbei ist aber zu beachten, daß bei der direkten Veraschung infolge nicht hinreichenden Gehaltes der Asche an Kationen beträchtliche Verluste an Schwefel entstehen können. Die Veraschung muß daher stets nach S. 1220 unter alkalischen Zusätzen erfolgen. Dabei ist ferner folgendes zu beachten:

$\alpha\alpha$ ) Die schwefelhaltigen Verbrennungsgase des Leuchtgases müssen von der Asche ferngehalten werden; dies geschieht in der oben (S. 1216) beschriebenen Weise.

$\beta\beta$ ) Beim Veraschen mit alkalischen Zusätzen können sich durch die Reduktionswirkung der Kohle mehr oder weniger Sulfide bilden, die beim Lösen der Asche in Salzsäure einen Verlust an Schwefel zur Folge haben würden. Um solche Verluste zu verhüten, setzt man vor der Lösung der Asche etwas reine (schwefelfreie) Wasserstoffsperoxydlösung oder schwefelfreie Kaliumpermanganatlösung bis zur bleibenden Rotfärbung zur Asche hinzu.

Die so gewonnene Asche dampft man zur Abscheidung der Kieselsäure auf dem Wasserbade zur Trockne, nimmt den Rückstand mit salzsäurehaltigem Wasser auf, filtriert und bestimmt in der Lösung oder einem aliquoten Teil davon die Schwefelsäure nach einem der unter b) beschriebenen Verfahren.

b) **Bestimmung der Schwefelsäure.**  $\alpha$ ) Bestimmung als Bariumsulfat<sup>2</sup>. Die verdünnte schwefelsäurehaltige, schwach salzsaure Lösung wird zum Sieden erhitzt und mit der ebenfalls zum Sieden erhitzten verdünnten Bariumchloridlösung unter beständigem Umrühren in einem Gusse versetzt. Nach halbstündigem Stehen — am besten in der Wärme — wird der Niederschlag durch ein Papierfilter oder einen GOOCH-Tiegel mit Asbestfilter<sup>3</sup> abfiltriert, ausgewaschen und bei Verwendung des Asbestfilters nach dem Trocknen mäßig stark geglüht und als Bariumsulfat gewogen; hat man ein Papierfilter verwendet, so verbrennt man nach kurzem Trocknen das Filter noch naß im Tiegel und glüht mäßig.

$$\text{Bariumsulfat} \times 0,3430 = \text{Schwefelsäure (SO}_3\text{)}.$$

Bei der Ausführung dieser Bestimmung ist folgendes zu beachten:

1. Bei Lösungen, die größere Mengen von Ferrisalzen enthalten, muß das Eisen vor der Fällung mit Bariumchlorid durch einen größeren Überschuß an Ammoniak abgeschieden werden; ebenso müssen größere Mengen von Calcium vorher durch Ammoniumcarbonat und Ammoniak entfernt werden.

2. Salpetersäure und Chlorsäure müssen vorher durch Eindampfen mit Salzsäure zersetzt werden.

3. Die Lösung muß hinreichend verdünnt und darf nicht zu sauer sein; bei 1—2 g zu erwartendem Bariumsulfat muß die Lösung auf 350—400 ccm verdünnt werden und 1 ccm konz. Salzsäure (1,17) enthalten. Beim Vorliegen stark salzsaurer Lösung dampft man diese

<sup>1</sup> A. KONARSKY: Biochem. Zeitschr. 1927, 187, 398.

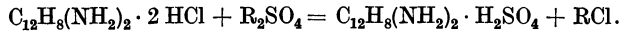
<sup>2</sup> Nach F. P. TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, 11. Aufl., Bd. 2, S. 398, 1930.

<sup>3</sup> Vgl. J. GROSSFELD: Z. 1915, 29, 67. Nach ihm wird das Asbestfilter zweckmäßig mit gereinigter Kieselgur gedichtet.

zur Trockne und nimmt mit Wasser auf oder man neutralisiert die Lösung mit Ammoniak gegen Methylorange und setzt in beiden Fällen zu der entsprechend verdünnten Lösung 1 ccm konz. Salzsäure hinzu.

4. Die Bariumchloridlösung darf nicht zu konzentriert sein; sie soll in 100 ccm 10 ccm N.-Bariumchloridlösung enthalten.

β) Titrimetrische Bestimmung mit Benzidinchlorhydrat. Das von W. J. MÜLLER<sup>1</sup> herrührende, auch bei kleinen Mengen Schwefelsäure gut anwendbare Verfahren beruht auf der Reaktion:



Das Benzidinsulfat ist in Wasser bzw. Benzidinchlorhydratlösung unlöslich, der Überschuß an Chlorhydrat kann daher mit Natronlauge zurücktitriert werden.

αα) W. J. MÜLLER und K. DÜRKES<sup>2</sup> führen die Bestimmung, wie folgt, aus: Die zu untersuchende Lösung, etwa 0,3—0,05 g Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) enthaltend, wird mit Natronlauge genau gegen Phenolphthalein neutralisiert; dann setzt man so viel Wasser hinzu, daß nach Zugabe der Benzidinchlorhydratlösung etwa 20 ccm bis zur Marke des (z. B. 250 ccm-) Meßkolbens fehlen. Die Lösung wird auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt, eine genau gemessene Menge Benzidinchlorhydratlösung (10—20 ccm Überschuß) zugesetzt, noch einmal zum Sieden erhitzt, nach dem Erkalten mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt, umgeschüttelt und durch ein trockenes Filter filtriert. Unter Verwerfung der ersten Teile des Filtrates werden 200 ccm zur Rücktitration des Benzidinchlorhydratüberschusses mit 0,25 N.-Natronlauge gegen Phenolphthalein verwendet.

Bei der Ausführung der Bestimmung ist noch folgendes zu beachten: Benzidinchlorhydratlösung: 25 g Benzidinchlorhydrat werden unter Zusatz von 30 ccm verd. Salzsäure ( $d = 1,05$ ) zu 1 Liter gelöst und die Lösung mit 0,25 N.-Natronlauge gegen Phenolphthalein eingestellt.

Bei geringeren Schwefelsäuregehalten (0,05—0,01 g  $H_2SO_4$ ) verwendet man eine Lösung von etwa 7 g Benzidinchlorhydrat in 1 Liter und titriert mit 0,05 N.-Natronlauge.

Volumen der Lösung. Da das Benzidinsulfat immer etwas Chlorhydrat adsorptiv mitreißt und diese Menge von der Stärke der Fällung und der Konzentration der Lösung abhängig ist, verwendet man zweckmäßig bei einem Gehalt der Lösung an

|                                 |       |           |          |             |
|---------------------------------|-------|-----------|----------|-------------|
| Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) von | 1—0,4 | 0,5—0,075 | 0,1—0,05 | 0,05—0,01 g |
| an Lösung . . . . .             | 500   | 250       | 100      | 50 ccm.     |

Ebenso ist die Adsorption in der Wärme geringer als in kalten Lösungen.

ββ) F. RASCHIG<sup>3</sup> titriert nicht die Menge des unverbrauchten Benzidinchlorhydrats, sondern den Benzidinsulfatniederschlag selbst. Er verwendet ferner eine verdünntere Benzidinlösung, indem er 18,5 g Benzidin mit 200 ccm 0,1 N.-Salzsäure und 1 Liter Wasser<sup>4</sup> unter Erwärmen löst, die Lösung filtriert und auf 10 Liter verdünnt<sup>4</sup>. Von dieser Lösung verwendet er 150 ccm auf 0,1 g erwartete Schwefelsäure. Mit dieser Flüssigkeit wird die zu untersuchende Lösung, die nicht vorher neutralisiert zu werden braucht, kalt unter Umrühren gemischt und nach 5 Minuten ist alle Schwefelsäure abgeschieden. Man filtriert den Benzidinsulfatniederschlag auf einem Saugfilter ab, wäscht ihn mit nicht zuviel Wasser aus, bringt das Filter mit dem Niederschlag in einen kleinen ERLÉNMEYER-Kolben, gibt 50 ccm Wasser hinzu, setzt einen Gummistopfen auf, schüttelt etwa eine halbe Minute kräftig durch und titriert nach Abspülen des Stopfens und der oberen Gefäßwand und Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein mit 0,1 N.-Natronlauge. Sobald die Rotfärbung nicht mehr schnell verschwindet, erwärmt man die Flüssigkeit bzw. den Brei auf 50° und titriert zu Ende. Die Bestimmung kann in etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde ausgeführt werden.

<sup>1</sup> W. J. MÜLLER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, **35**, 1587.

<sup>2</sup> W. J. MÜLLER u. K. DÜRKES: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, **42**, 477.

<sup>3</sup> F. RASCHIG: Zeitschr. angew. Chem. 1903, **16**, 617. Vgl. dazu W. J. MÜLLER: Daselbst 1903, **16**, 653.

<sup>4</sup> Dazu verwendetes Wasser muß kohlenstofffrei sein.

Bei geringen Sulfatmengen fallen die Ergebnisse wegen der erforderlichen Menge Waschwasser bei der immerhin zu berücksichtigenden Löslichkeit des Benzidinsulfats in Wasser — 10 ccm Wasser lösen 0,8 mg Benzidinsulfat — etwas zu niedrig aus. Eisenoxydsalze stören die Bestimmung; das Eisenoxyd muß daher vorher mit Ammoniak ausgeschieden und abfiltriert werden; ebenso müssen Zink, Mangan usw. vorher aus der Lösung ausgeschieden werden.

γ) Mikrobestimmung. αα) J. BODNÁR und L. BARTA<sup>1</sup> haben das Benzidinverfahren zu einem Mikroverfahren ausgearbeitet, bei dem der Benzidinsulfatniederschlag in einem Zentrifugenrohr mit sehr verdünnter Benzidinsulfatlösung gewaschen und dann ähnlich wie bei RASCHIG mit 0,01 N.-Natronlauge titriert wird.

ββ) Colorimetrische Bestimmung nach K. LANG<sup>2</sup>. Die Schwefelsäure wird mittels Bariumchromats in saurer Lösung als Bariumsulfat ausgefällt und das überschüssige Bariumchromat mit Calciumhydroxyd beseitigt, wobei die freie Chromsäure in Lösung bleibt. Ihre Menge wird dann durch eine Farbenreaktion mit Diphenylcarbazid (Rotviolett-färbung) ermittelt.

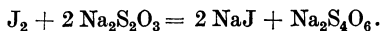
## 5. Schweflige Säure.

Schweflige Säure (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) findet als Salz, in Lösung und als Anhydrid (Schwefeldioxyd, SO<sub>2</sub>) in Gasform als Konservierungsmittel für Lebensmittel vielfache Verwendung. Gelegentlich sollen auch Thiosulfatlösungen zum gleichen Zwecke dienen.

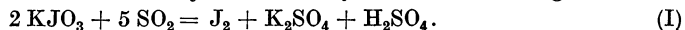
Eigenschaften. Die kennzeichnendste Eigenschaft der Schwefligen Säure und des Schwefeldioxyds ist ihre stark reduzierende und bleichende Wirkung. Mercurichlorid wird zu Mercurchlorid, Mercuronitrat zu Quecksilber, Chromsäure zu grünem Chromisalz reduziert. Die Schweflige Säure selbst wird durch Wasserstoff zu Schwefelwasserstoff reduziert und durch Kaliumpermanganat in saurer Lösung unter gleichzeitiger Bildung von wechselnden Mengen Dithionsäure (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>) zu Schwefelsäure oxydiert. Die Blei-, Silber- und Bariumsalze sind in Wasser schwer löslich; 100 ccm Wasser (18°) lösen 2,2 mg Bariumsulfid.

Unterschwefligsaure Salze (Thiosulfate) werden durch verd. Schwefel- und Salzsäure unter Abscheidung von Schwefel zu schwefligsauren Salzen zersetzt.

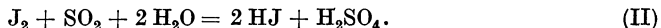
Bariumthiosulfat ist in Wasser ziemlich schwer löslich; 100 ccm Wasser (18°) lösen 200 mg. — Aus Silber-, Blei-, Mercur- und Zinnsalzen scheiden sich beim Kochen mit Thiosulfaten die Sulfide ab. — Jodlösungen werden durch Thiosulfate unter Bildung von Jodid und Tetrathionat entfärbt:



a) Nachweis. α) Reduktion von Jodlösungen. Durch Einwirkung von Schwefliger Säure bzw. Schwefeldioxyd auf Alkalijodat wird Jod abgeschieden:



Durch Einwirkung weiterer Mengen Schwefeldioxyd wird das Jod zu Jodwasserstoff reduziert:



Ausführung. αα) Die auf Schweflige Säure zu prüfende Lösung oder Substanz wird in einem 100 ccm-ERLENMEYER-Kölbchen mit verd. Phosphorsäure angesäuert und das Kölbchen sofort mit einem Korkstopfen verschlossen, in dessen unteres, mit einem Spalt versehenes Ende ein Streifen Kaliumjodat-Stärkepapier<sup>3</sup> so befestigt ist, daß sein unteres, etwa 1 cm lang mit Wasser befeuchtetes Ende sich ungefähr 1—2 cm über der Mitte des zu untersuchenden Reaktionsgemisches befindet. Zeigt sich innerhalb 10 Minuten eine bleibende oder vorübergehende Bläuung des Streifens, die zuerst gewöhnlich an der Grenzlinie des feuchten und trockenen Teiles des Papiers eintritt, so ist Schweflige Säure vorhanden.

<sup>1</sup> J. BODNÁR u. L. BARTA: Biochem. Zeitschr. 1930, 227, 429.

<sup>2</sup> K. LANG: Biochem. Zeitschr. 1929, 213, 469.

<sup>3</sup> Das Kaliumjodat-Stärkepapier wird hergestellt, indem man Filtrierpapier mit einer Lösung von 0,1 g Kaliumjodat und 1 g löslicher Stärke in 100 ccm Wasser trinkt. Das getrocknete Papier muß farblos sein.

Zeigt sich keine Bläuung des Papiers, so stellt man das Kölbchen bei gelockertem Kölbchenverschluß noch 10 Minuten auf ein Wasserbad und beobachtet weiter.

Sind größere Mengen von Schwefliger Säure vorhanden, so kann eine alsbald eingetretene Bläuung durch die oben an zweiter Stelle angegebene Reaktion sehr schnell wieder verschwinden; es empfiehlt sich daher sofort nach dem Verschluß des Kölbchens das Verhalten des Reagenspapiers einige Zeit ständig zu beobachten.

$\beta\beta$ ) J. BOUGAULT und E. CATTELAİN<sup>1</sup> empfehlen, den Nachweis der Schwefligen Säure durch Entfärbung von durch Joddämpfe gebläutem Jod-Stärkepapier zu erbringen.

Das Jod-Stärkepapier stellt man her durch Tränken von Filtrierpapierstreifen mit einer 0,5%igen Stärkelösung und Trocknen bei 30°. Die Streifen werden in einer Flasche mit Glasstopfen aufbewahrt und vor dem Gebrauch zuerst mit 1—2 Tropfen einer Kaliumjodidlösung (0,1%), die frei von Jodat ist, angefeuchtet und dann 5—10 Sekunden über die Öffnung einer mit 0,1 N.-Jodlösung gefüllten Flasche gehalten. Die nunmehr schwach bläuliche Färbung des Papiers verschwindet bei Anwesenheit geringer Mengen Schwefliger Säure.

Zum Nachweis gibt man etwa 20 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit in eine 150 ccm fassende Flasche mit breiter Öffnung und eingeschliffenem Glasstopfen. Nach dem Ansäuern mit verd. Schwefel- oder Phosphorsäure hängt man sogleich das Reagenspapier in die Flasche, indem man es zwischen Stopfen und Hals der Flasche derart einklemmt, daß ein Teil des Papiers frei in die Flasche hinein hängt und verschließt diese hermetisch mit einer Lösung von Acetylcellulose in Aceton.

Die Reaktion gestattet durch sofortigen Eintritt noch 0,0422 mg Schwefeldioxyd in 10 ccm Flüssigkeit nachzuweisen, was einem Gehalt von etwa 4 mg/l entspricht; bei einem Gehalt von etwa 2 mg/l tritt die Reaktion in etwa 5 Minuten ein.

$\beta$ ) Farbenreaktion nach E. EGGRIWE<sup>2</sup>. Gibt man zu einer wäßrigen Lösung eines Sulfits die Lösung eines durch die Einwirkung von salzsaurem Nitrosodimethylanilin auf  $\beta$ -Naphthol gewonnenen Oxazinfarbstoffes, z. B. Echtblau R in Krystallen, Baumwollblau R oder Meldolablau, so verschwindet die violette Farbe und es tritt nach und nach eine schöne Gelbfärbung auf. Mit einer Menge von 0,01 mg Nitrition in 1 ccm Lösung können noch 8 Tropfen Reagenslösung nach und nach in Reaktion gebracht werden. In 0,35 ccm einer Natriumsulfid enthaltenden Lösung konnten noch 0,002 mg Nitrition nachgewiesen werden.

Thiosulfate und Thionate geben die Reaktion nicht, dagegen entfärben Sulfidion, Polysulfidion und Hydroxylion das Reagens ebenfalls; erstere müssen vorher am besten durch Fällung mit in Wasser aufgeschlämmtem Cadmiumcarbonat entfernt werden, während die Hydroxylionen — durch Einleiten von Kohlendioxyd bis zur Entfärbung der mit einigen Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzten, rot gefärbten Lösung — in Hydrocarbonationen übergeführt werden, welche letzteren den Farbstoff nicht verändern.

$\gamma$ ) Sonstige Reaktionen.  $\alpha\alpha$ ) Reaktion mit Benzidin. Nach S. ROTHENFUSSER kann das Verfahren zur Bestimmung mit Benzidin (S. 1255) auch zum Nachweise von Schwefliger Säure dienen. Eine Ausscheidung von Benzidinsulfat nach dem Überdestillieren von einigen ccm zeigt die Gegenwart von Schwefliger Säure an.

$\beta\beta$ ) Reaktion nach G. DENIGÉS. Cadmium-anilinnitratlösung (5 g Cadmiumnitrat, 2,5 g Anilin und 100 ccm Wasser) fällt aus Sulfiten einen weißen krystallinen Niederschlag<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> J. BOUGAULT u. E. CATTELAİN: Ann. Falsif. 1932, 25, 138; Zeitschr. analyt. Chem. 1933, 91, 381.

<sup>2</sup> E. EGGRIWE: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 69, 384.

<sup>3</sup> G. GUTZEIT: Helv. chim. Acta 1929, 12, 713; Zeitschr. analyt. Chem. 1930, 82, 182.

$\gamma\gamma$ ) BÖDEKES Reaktion. Eine neutrale Sulfitlösung gibt mit verd. Natriumnitroprussidlösung eine schwache Rosafärbung und bei Zusatz von viel Zinksulfat eine deutliche Rotfärbung. Die Reaktion ist noch empfindlicher bei Zusatz von wenig Kaliumferrocyanid, wobei ein roter Niederschlag entsteht (Unterschied von Thiosulfat)<sup>1</sup>.

### Unterscheidung von Sulfit und Thiosulfat.

Zur Unterscheidung können folgende Reaktionen dienen:

1. Bei Thiosulfatlösungen scheidet sich auf Zusatz von verd. Schwefel- oder Salzsäure neben der Entwicklung von Schwefliger Säure Schwefel ab.
2. Das Strontiumthiosulfat ist leicht löslich in Wasser (100 ccm Wasser [18°] lösen 27 g), während Strontiumsulfid darin schwer löslich ist; 100 ccm Wasser (18°) lösen 3,3 mg. W. AUTENRIETH und A. WINDAUS<sup>1</sup> begründen hierauf ein Verfahren zum Nachweis von Sulfid (fällbar durch Cadmiumcarbonat), Sulfit und Thiosulfat nebeneinander.
3. BÖDEKESche Reaktion; siehe oben.

**b) Bestimmung.** Enthält die zu untersuchende Lösung außer Schwefliger Säure keine oxydierbaren oder halogenbindenden Stoffe, so können die Bestimmungen in der Lösung selbst erfolgen; im anderen Falle ist die Schweflige Säure zunächst durch Destillation im Kohlensäurestrome von den störenden Stoffen zu trennen.

Destillation im Kohlensäurestrome. Man bringt die zu untersuchende Substanz mit etwa 200 ccm ausgekochtem Wasser in einen Destillierkolben von etwa 500 ccm Inhalt und rührt unter Zusatz von Natriumcarbonatlösung bis zur schwach alkalischen Reaktion an. Nach einstündigem Stehen wird der Kolben mit einem zweimal durchbohrten Stopfen verschlossen, durch welchen zwei Glasröhren in das Innere des Kolbens führen. Die erste Röhre reicht bis auf den Boden des Kolbens, die zweite nur bis in den Hals. Die letztere Röhre ist mit einem LIEBIGSchen Kühler verbunden, an den sich luftdicht mittels durchbohrten Stopfens eine PELIGOTSche Röhre anschließt. Man leitet durch das bis auf den Boden des Kolbens führende Rohr Kohlensäure ein, bis alle Luft aus dem Apparat verdrängt ist, bringt dann in die PELIGOTSche Röhre die Absorptions- bzw. Oxydationslösung, lüftet den Stopfen des Destillierkolbens und läßt, ohne das Einstromen der Kohlensäure zu unterbrechen, 10 ccm einer Phosphorsäurelösung (25%) einfließen. Darauf schließt man den Stopfen wieder, erhitzt den Kolbeninhalt vorsichtig und destilliert unter stetigem Durchleiten von Kohlensäure die Hälfte der wäßrigen Lösung ab.

K. K. JÄRVINEN<sup>2</sup> empfiehlt, die Entwicklung des Kohlendioxyds im Destillationsgefäße selbst aus Marmor und Salzsäure vorzunehmen.

$\alpha$ ) Bestimmung als Bariumsulfat. Man gibt bei der vorstehenden Destillation in die PELIGOTSche Röhre als Oxydationsflüssigkeit 50 ccm Jodkaliumjodidlösung (5 g Jod und 7,5 g Kaliumjodid mit Wasser zu einem Liter gelöst) oder 50—80 ccm schwefelsäurefreie Wasserstoffsuperoxydlösung (3%). Beide Oxydationsmittel oxydieren die Schweflige Säure zu Schwefelsäure, die dann nach S. 1251 als Bariumsulfat bestimmt wird. Bariumsulfat  $\times$  0,2744 = Schwefeldioxyd (SO<sub>2</sub>).

V. FROBOESE<sup>3</sup> fängt das Destillat in titrierter Natriumbicarbonatlösung auf, oxydiert mit Wasserstoffsuperoxyd und titriert mit Salzsäure den Überschuß an Natriumcarbonat gegen Methylorange zurück; außerdem kann die gebildete Schwefelsäure auch als Bariumsulfat bestimmt werden.

$\beta$ ) Bestimmung als Benzidinsulfat. S. ROTHENFUSSER<sup>4</sup> destilliert aus der zu untersuchenden Substanz die Schweflige Säure aus einem 500 ccm-Rundkolben wie oben ab und fängt bei senkrecht stehendem Kühler das Destillat in einer mit dem Apparat durch Gummistopfen dicht verbundenen, unten verjüngten zylindrischen Vorlage<sup>5</sup> auf, in der das Einleitungsrohr, das am

<sup>1</sup> W. AUTENRIETH u. A. WINDAUS: Zeitschr. analyt. Chem. 1898, **37**, 290.

<sup>2</sup> K. K. JÄRVINEN: Z. 1925, **49**, 283.

<sup>3</sup> V. FROBOESE: Arb. Reichsgesundh.-Amt 1920, **52**, 657; C. 1921, IV, 225.

<sup>4</sup> S. ROTHENFUSSER: Z. 1929, **58**, 98.

<sup>5</sup> Die Vorlage bzw. die ganze Apparatur kann von der Glasbläserei W. Neumann in München, Theresienstr. 78, bezogen werden.



Ende etwas aufgetrieben und mit kleinen Öffnungen versehen ist, bis an den Boden reicht.

In der Vorlage befinden sich 5 ccm filtrierte 5%ige Benzidinlösung (in 96%igem Alkohol), 5 ccm Essigsäure (30%), gemischt mit 5 ccm Wasserstoff-superoxydlösung (3%). Durch letztere wird die Schweflige Säure zu Schwefelsäure oxydiert und diese durch das Benzidin gefällt (vgl. S. 1252). Das Benzidinsulfat wird 5 Minuten nach Beendigung der Destillation durch einen Gooch-Tiegel oder einen Jenaer Glasfertierteigel, beide mit Asbestfilter, abgesaugt, zwei- bis dreimal mit 5 ccm Wasser nachgewaschen, etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 105° getrocknet und gewogen. Benzidinsulfat  $\times 0,234 =$  Schwefeldioxyd (SO<sub>2</sub>).

Eine Destillation im Kohlensäurestrom ist nach S. ROTHENFUSSER bei diesem Verfahren nicht erforderlich. Er fand die Löslichkeit des Benzidinsulfats bei 15° in Wasser zu 10 mg-%, in 95%igem Alkohol zu 4,2 mg-% und in Mischungen von 5 ccm Essigsäure (30%), 5—50 ccm Alkohol und 45—90 ccm Wasser zu 2—7,5 mg-%.

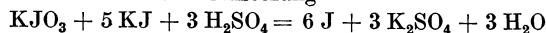
γ) Jodometrische Bestimmung. Sie kann nach jeder der beiden oben (S. 1253) angegebenen Reaktionen erfolgen.

αα) Liegt ein Salz oder eine Lösung zur Untersuchung vor, die außer der Schwefligen keine anderen oxydierbaren oder jodaufnehmenden Stoffe enthalten, so kann die unmittelbare Titration mit Jodlösung im Sinne der Gleichung (II) erfolgen: Zu 30 ccm einer mit Salzsäure angesäuerten 0,1 N.-Jodlösung (in Kaliumjodid) läßt man aus einer Bürette die nötigenfalls entsprechend verdünnte Sulfatlösung oder Schweflige Säure unter ständigem Umschütteln hinzuließen, bis Entfärbung eintritt. Hierzu sollen nicht mehr als etwa 15 ccm Säure- bzw. Sulfatlösung erforderlich sein. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 3,203 mg Schwefeldioxyd (SO<sub>2</sub>).

ββ) Jodat-Titration. Eine Destillation der Schwefligen Säure (S. 1255) in eine abgemessene Menge titrierter Jodlösung liefert ungenaue Ergebnisse, da durch den Kohlensäurestrom Jod aus der Vorlage mit weggerissen wird; dagegen kann man die Schweflige Säure mit einer Jodatlösung im Sinne der Gleichung (I) (S. 1253) oxydieren und den Überschuß an letzterer zurücktitrieren<sup>1</sup>.

In Anlehnung an TH. SCHUMACHER und E. FEDER<sup>2</sup> verfährt man, wie folgt: Bei der Destillation im Kohlensäurestrom (S. 1255) gibt man in die als Vorlage dienende PELIGOTSCHE Röhre 50 ccm Kaliumjodatlösung (14,84 g Kaliumjodat im Liter enthaltend).

Die Einstellung der Kaliumjodatlösung geschieht in der Weise, daß man zu einer abgemessenen Menge der Lösung einen Überschuß von Kaliumjodid und Schwefelsäure gibt und das dabei ausgeschiedene Jod mit 0,5 oder 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung in bekannter Weise titriert. Nach der Umsetzung



entspricht 1 ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung 3,203 mg Schwefeldioxyd (SO<sub>2</sub>).

Nach Beendigung der Destillation wird der Inhalt der Vorlage in einen ERLÉNMEYER-Kolben gespült und das ausgeschiedene Jod durch Kochen auf dem Drahtnetz vertrieben, dann nach 5—10 Minuten weiter gekocht und der noch vorhandene Überschuß an Jodat wie vorstehend bestimmt und in ccm 0,1 N.-Thiosulfatlösung ausgedrückt.

γγ) Sonstige Oxydationsverfahren haben noch angegeben C. MAYR u. J. PEYFUSS<sup>3</sup>, sowie W. MANCHOT und F. OBERHAUSER<sup>4</sup>, die die Schweflige Säure mit Brom

<sup>1</sup> W. FEIT u. K. KUBLERSCHKY: Chem.-Ztg. 1891, 15, 351. Sie verwendeten eine Bromatlösung. — Vgl. ferner SCHWICKER: Dasselbst S. 845.

<sup>2</sup> TH. SCHUMACHER u. E. FEDER: Z. 1905, 10, 415 u. 649. — Vgl. auch W. S. HENDRIXSON: Journ. Amer. Chem. Soc. 1925, 47, 1319 u. 2156; C. 1925, II, 585 u. 1881.

<sup>3</sup> C. MAYR u. J. PEYFUSS: Zeitschr. anorg. Chem. 1923, 127, 123.

<sup>4</sup> W. MANCHOT u. F. OBERHAUSER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1924, 57, 29.

oxydieren, J. BICSKEI<sup>1</sup>, der mit Natriumhypochlorit oxydiert und G. ALSTERBERG<sup>2</sup>, der die Oxydation mit Kaliumpermanganat unter Zuhilfenahme von Jodecyan durchführt. PH. PHOTIADIS<sup>3</sup> oxydiert die Schweflige Säure im Destillat mit Wasserstoffsperoxyd, titriert mit Ammoniumchromatlösung und bestimmt schließlich deren Überschuß jodometrisch.

### Bestimmung der Unterschweifigen Säure.

1. Bestimmung der Unterschweifigen Säure. Wenn in der zu untersuchenden Substanz keine anderen oxydierbaren oder Jod bindenden Stoffe vorhanden sind, so kann die Bestimmung der Unterschweifigen Säure ( $H_2S_2O_3$ ) mit Hilfe einer Lösung von Jod in Kaliumjodid (deren Titer mit Kaliumjodat nach S. 1256 eingestellt wird, erfolgen. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 11,212 mg Unterschweifiger Säure ( $S_2O_3$ ) = 15,811 mg Natriumthiosulfat ( $Na_2S_2O_3$ ) bzw. 24,812 mg kryst. Natriumthiosulfat ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$ ).

2. Bestimmung von Schwefliger und Unterschweifiger Säure nebeneinander. Nach W. AUTENRIETH und A. WINDAUS<sup>4</sup> löst man 1–3 g Substanz in 100 ccm Wasser und nimmt von dieser Lösung bzw. von einer etwa vorliegenden Lösung: I. 10 oder 20 ccm zur Titration mit 0,1 N.-Jodlösung zur Oxydation von Sulfid + Thiosulfat. II. Weitere 20–50 ccm der ursprünglichen Lösung versetzt man in einem 100 ccm-Kolben mit Strontiumnitratlösung im Überschuß, füllt auf 100 ccm auf und schüttelt durch. Nach mehrstündigem Stehenlassen filtriert man durch ein trockenes Filter und titriert in 50 ccm das Thiosulfat mit 0,1 N.-Jodlösung. Da 100 ccm Wasser 3,3 mg Strontiumsulfid lösen (S. 1255), die 0,4 ccm 0,1 N.-Jodlösung entsprechen, so ist von dem Jodwert II ein entsprechender Abzug zu machen. Die Differenz ist der zur Oxydation der Schwefligen Säure erforderliche Jodwert. Zieht man diesen von dem nach I verbrauchten Jodwert ab, so erhält man die zur Oxydation der Unterschweifigen Säure verbrauchte Jodmenge.

3. Ein weiteres Verfahren, welches auf der Fällung mit Mercurichlorid beruht, haben W. FELD<sup>5</sup> sowie A. SANDER<sup>6</sup> beschrieben.

## 6. Phosphorsäure.

Phosphor findet sich in Lebensmitteln teils als Phosphorsäure in anorganischer Bindung, größtenteils aber in Bindung an organische Stoffe (Proteine, Lecithine usw.).

Man bestimmt den Gesamt-Phosphor nach den S. 587 und 600 angegebenen Verfahren oder in den sonstigen durch Aufschließung mit Säuren hergestellten Lösungen (S. 1221), meist aber in der mit alkalischen Zusätzen hergestellten Asche (S. 1220). In letzterer ist der Gesamt-Phosphor als Orthophosphat vorhanden, während bei der ohne solche Zusätze erfolgenden Veraschung bei vielen Lebensmitteln ein beträchtlicher Teil des Phosphors durch Verflüchtigung verloren geht und ein weiterer Teil als Pyro- oder Metaphosphat in der Asche vorhanden ist. Zur Bestimmung dieser drei Phosphatarten dient das S. 1219 angegebene Verfahren.

Zwecks Entfernung der bei der Phosphorsäurebestimmung störend wirkenden Kieselsäure wird die Asche mit Salpetersäure aufgenommen und auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft.

Von den zahlreichen Verfahren zur Phosphorsäurebestimmung<sup>7</sup> empfiehlt H. KLEINMANN<sup>7</sup> bei Mengen von über 25 mg  $P_2O_5$  die gewichtsanalytischen Verfahren, bei geringeren Mengen bis zu 1 mg herab die maßanalytische Bestimmung nach A. NEUMANN in der Abänderung von H. KLEINMANN<sup>7</sup>; bei Mengen unter 1 mg verwendet man die colorimetrische und bei solchen unter

<sup>1</sup> J. BICSKEI: Zeitschr. anorg. Chem. 1927, **160**, 64.

<sup>2</sup> G. ALSTERBERG: Biochem. Zeitschr. 1926, **172**, 223.

<sup>3</sup> PH. PHOTIADIS: Zeitschr. analyt. Chem. 1933, **91**, 181.

<sup>4</sup> W. AUTENRIETH u. A. WINDAUS: Zeitschr. analyt. Chem. 1898, **37**, 290.

<sup>5</sup> W. FELD: Zeitschr. angew. Chem. 1911, **24**, 290 u. 1161.

<sup>6</sup> A. SANDER: Zeitschr. angew. Chem. 1915, **28**, 9 u. 1916, **29**, 11; Chem.-Ztg. 1915, **39**, 945.

<sup>7</sup> Eine ausführliche Zusammenstellung bringen H. KLEINMANN (Biochem. Zeitschr. 1919, **99**, 19, 45, 95, 115, 150) und M. ISHIBASCHI (Zeitschr. analyt. Chem. 1931, **84**, 261).

0,1 mg die nephelometrische Bestimmung, durch welche noch 0,0005 mg = 0,5  $\gamma$  bestimmt werden können.

**a) Bestimmung als Ammoniumphosphormolybdat.** Der gelbe Niederschlag, welcher in salpetersaurer Lösung bei Gegenwart von Ammoniumnitrat durch Ammoniummolybdat entsteht, hat nach FR. HUNDESHAGEN<sup>1</sup> die Zusammensetzung



N. v. LORENZ<sup>2</sup> wägt diesen Niederschlag als solchen nach dem Entwässern direkt; FINKENER<sup>3</sup> erhitzt ihn auf 160—180° und erhält dadurch  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , 12  $\text{MoO}_3$ , während R. WOY<sup>4</sup> durch schwaches Glühen einen blaugrünschwarzen Rückstand von Phosphormolybdänsäureanhydrid (24  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) erhält.

Wegen des hohen Molekulargewichtes dieser Verbindungen sind die Bestimmungen recht genau (1 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$  = 30,35 mg Ammoniumphosphormolybdat) und sie besitzen dabei den Vorzug, daß sie auch in Lösungen, welche beliebige Metalle enthalten, ausgeführt werden können. Dagegen wirken größere Mengen Salzsäure, ferner Ammoniumoxalat, -tartrat<sup>5</sup> und -citrat und organische Substanzen störend; auch Kieselsäure muß aus Aschenlösungen vorher entfernt werden.

$\alpha$ ) Bestimmung nach N. v. LORENZ<sup>2</sup> als Ammoniumphosphormolybdat. Die Bestimmung wird nach W. PLÜCKER<sup>6</sup>, wie folgt, ausgeführt:

Erforderliche Reagenzien. 1. Sulfat-Molybdänreagens. In einem 2—3 Liter fassenden Kolben werden 100 g Ammoniumsulfat mit 1 Liter Salpetersäure ( $d = 1,35$  bis 1,36) unter Umrühren gelöst. Desgleichen löst man 300 g Ammoniummolybdat in einem Literkolben in heißem Wasser, kühlt auf Zimmertemperatur ab, stellt auf die Marke ein und gießt die Lösung in dünnem Strahle unter Umrühren in die Ammoniumsulfatlösung. Man läßt wenigstens 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, filtriert durch ein säurefestes, dichtes Filter und hebt die fertige Lösung gut verschlossen im Dunkeln auf.

Die Lösung scheidet beim Aufbewahren im Lichte nach einiger Zeit Molybdänsäure ab. Solange keine Krustenbildung eintritt, ist das Reagens noch verwertbar, man hat nur darauf zu achten, daß es vollständig klar zur Verwendung gelangt. Auch ist es zweckmäßig, den Hals der Flasche nach dem jedesmaligen Gebrauch trocken auszuputzen, damit sich in ihrem Halse nichts ansetzt und ein Filtrieren vor dem Gebrauch sich erübrigt. Vor Licht geschützt, bleibt die Lösung fast unbegrenzt haltbar.

2. Salpetersäure von  $d = 1,19$ —1,21.

3. Schwefelsäurehaltige Salpetersäure. Man mischt 30 ccm Schwefelsäure ( $d = 1,84$ ) mit Salpetersäure ( $d = 1,19$ —1,21) zu 1 Liter.

4. Ammoniumnitratlösung (2%). Sollte die Lösung nicht an sich schon schwach sauer reagieren, so gibt man einige Tropfen Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu.

5. Alkohol (90—95%); er darf nicht alkalisch reagieren.

6. Äther. Er darf ebenfalls nicht alkalisch reagieren, muß alkoholfrei und nicht zu wasserhaltig sein. 150 ccm sollen 1 ccm Wasser vollständig und klar lösen.

Ausführung. Man erhitzt die Phosphorsäurelösung, deren Volumen 50 ccm betragen und die nicht mehr als 50 mg Phosphorsäure, 10—20 ccm Salpetersäure und 1 ccm Schwefelsäure enthalten soll, auf einem Drahtnetze, bis die ersten Blasen aufsteigen, nimmt vom Drahtnetz herunter, schwenkt einige Male um,

<sup>1</sup> FR. HUNDESHAGEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1889, 28, 141.

<sup>2</sup> N. v. LORENZ: Landw. Vers.-Stationen 1901, 55, 183.

<sup>3</sup> FINKENER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1878, 11, 1640; Zeitschr. analyt. Chem. 1882, 21, 566.

<sup>4</sup> R. WOY: Chem.-Ztg. 1897, 21, 442 u. 469.

<sup>5</sup> Nach H. v. JÜPTNER (Oesterr. Zeitschr. Berg- u. Hüttenw. 1894, 471) wirkt Weinsäure nicht störend; er empfiehlt sogar diese zur Molybdänsäure zuzusetzen, wenn es sich um die Bestimmung von Phosphorsäure im Eisen handelt.

<sup>6</sup> W. PLÜCKER: Z. 1909, 17, 446. — Das Verfahren ist auch von anderer Seite vielfach nachgeprüft und seine vorzügliche Brauchbarkeit bestätigt worden. Auch H. NEUBAUER u. F. LÜCKER (Zeitschr. analyt. Chem. 1912, 51, 170) geben eine genaue Vorschrift für die Anwendung des Verfahrens.

damit die Temperatur an den überhitzten Stellen ausgeglichen wird, und gießt in die Mitte der Lösung 50 ccm klares Sulfat-Molybdänreagens und zwar so, daß die Wandungen nicht benetzt werden. Wenn die Hauptmenge des Niederschlages sich zu Boden gesetzt hat, längstens nach 5 Minuten, rührt man mit Hilfe eines Glasstabes, der sich vorher nicht in der Lösung befinden soll,  $\frac{1}{2}$  Minute kräftig um. Nach 12—18 Stunden filtriert man durch einen Platin-GOOCH-Tiegel. Auf seinem Boden befindet sich ein Scheibchen nicht zu dichten, aschen- und fettfreien Filtrierpapiers, so zugeschnitten, daß es die Sieblöcher bedeckt, aber die Wandungen des Tiegels nicht berührt. Den Tiegel verbindet man mit einer Saugflasche mit Hahn, läßt das Scheibchen erst trocken ansaugen, gießt etwas Wasser darauf und saugt den Niederschlag ab. Man wäscht etwa viermal mit der Ammoniumnitratlösung (2%) aus und spült damit etwa noch im Becherglase befindliche Teilchen in den Tiegel. Man füllt den Tiegel einmal ganz voll und zweimal halbvoll Alkohol<sup>1</sup>, läßt fast vollständig absaugen und verfährt mit dem Äther<sup>1</sup> ebenso. Bei dem Waschen mit Äther ist darauf zu achten, daß der Niederschlag nicht trocken wird, damit nicht bei dem Aufgießen des Äthers etwas in Staubform durch den Tiegel gerissen wird, weshalb am besten möglichst rasch gearbeitet wird. Der Hahn der Saugflasche wird nun geschlossen, worauf man nach einigen Sekunden den Tiegel abnehmen kann. Man wischt ihn mit einem Tuche trocken ab und bringt ihn in einen Exsiccator, den man mit der Luftpumpe auf 100—200 mm Luftdruck evakuiert. Der Exsiccator darf weder Calciumchlorid noch sonst ein Trockenmittel enthalten. Man läßt den Tiegel  $\frac{1}{2}$  Stunde in dem Exsiccator und wägt dann sofort. Das Gewicht des Niederschlages, mit 0,03295 multipliziert, ergibt die vorhandene Menge Phosphorsäure ( $P_2O_5$ ).

Nach A. BÄURLE, W. RIEDEL und K. TÄUFEL<sup>2</sup> kann das Volumen der Lösung auch größer als 50 ccm sein; ein schädlicher Einfluß wurde bis zur dreifachen Menge (150 ccm) nicht festgestellt. Übersteigt dagegen die Konzentration an Schwefelsäure eine gewisse Grenze, so machen sich Verluste an Phosphorsäure geltend. 2 ccm konz. Schwefelsäure auf 50 ccm Flüssigkeitsvolumen beeinträchtigen die Bestimmung noch nicht. Eine Neutralisation mit Ammoniak ist nicht statthaft, da Ammoniumsulfat in höherer Konzentration die vollständige Ausfällung verhindert. Dagegen kann die störende freie Schwefelsäure ohne Schaden mit Natronlauge abgestumpft werden.

H. NEUBAUER und F. LÜCKER<sup>3</sup> verwenden statt Alkohol und Äther zum Auswaschen des Niederschlages Aceton. Es genügt dafür das gewöhnliche Acetonum purissimum des Handels, das in braunen Flaschen aufzubewahren ist. Es muß neutral reagieren, darf keine über 60° siedenden Anteile enthalten, muß sich mit dem gleichen Volumen Wasser klar mischen und darf keine wesentlichen Mengen Wasser, Ammoniak und Aldehyd enthalten. Die Verfasser geben die für diese Prüfung dienenden Reaktionen und ferner ein Verfahren zur Rückgewinnung des Acetons an.

Wiedergewinnung des Molybdäns. W. VENATOR<sup>4</sup> empfiehlt, die Lösungen von Ammoniumphosphormolybdat durch Zusatz von Eisenchlorid und Ammoniak von Phosphorsäure zu befreien, im Filtrat die Molybdänsäure mit Bariumchlorid zu fällen, den ausgewaschenen, getrockneten Niederschlag durch Behandeln mit Ammoniumsulfat zu zersetzen, das gebildete Bariumsulfat abzufiltrieren und im Filtrat das Ammoniummolybdat durch Krystallisation vom Ammoniumsulfat zu trennen.

Ein anderes Verfahren beschreibt H. BORNTRÄGER<sup>5</sup>.

β) Bestimmung nach R. WOY<sup>6</sup> als Phosphormolybdänsäureanhydrid.

Erforderliche Reagenzien. 1. Ammoniummolybdatlösung (3%), erhalten durch Lösen von 30 g Ammoniummolybdat,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ , zu 1 Liter; 1 ccm fällt 1 mg  $P_2O_5$ .

<sup>1</sup> Über die Anwendung von Aceton siehe unten.

<sup>2</sup> A. BÄURLE, W. RIEDEL u. K. TÄUFEL: Z. 1934, 67, 274.

<sup>3</sup> H. NEUBAUER u. F. LÜCKER: Zeitschr. analyt. Chem. 1912, 51, 170.

<sup>4</sup> W. VENATOR: Chem.-Ztg. 1885, 9, 1068.

<sup>5</sup> H. BORNTRÄGER: Zeitschr. analyt. Chem. 1894, 33, 341

<sup>6</sup> R. WOY: Chem.-Ztg. 1897, 21, 442 u. 469.

2. Ammoniumnitratlösung. 340 g Ammoniumnitrat zu 1 Liter gelöst.
3. Salpetersäure ( $d = 1,153$ ), 25%  $\text{HNO}_3$  enthaltend.
4. Waschflüssigkeit. 50 g Ammoniumnitrat und 40 ccm Salpetersäure zu 1 Liter gelöst.

Ausführung. Zu 50 ccm der zu untersuchenden, neutralen oder schwach salpetersauren Lösung, welche höchstens 0,1 g Phosphorsäure ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) enthalten darf<sup>1</sup>, gibt man in einem 400 ccm-Becherglase 30 ccm Ammoniumnitratlösung und 10—20 ccm Salpetersäure, erhitzt bis zum Sieden und gibt 120 ccm siedend heiße Ammoniummolybdatlösung<sup>1</sup> in dünnem Strahle unter stetem Umschwenken mitten in die heiße Phosphorsäurelösung hinein. Man schwenkt das Becherglas noch etwa 1 Minute lang um, läßt dann  $\frac{1}{4}$  Stunde stehen, gießt die überstehende Flüssigkeit durch ein Filter und dekantiert einmal mit 50 ccm heißer Waschflüssigkeit. Hierauf löst man den Niederschlag in 10 ccm Ammoniak (8%), fügt 20 ccm Ammoniumnitrat, 30 ccm Wasser und 1 ccm Ammoniummolybdatlösung hinzu, erhitzt bis zum Sieden und setzt 20 ccm heiße Salpetersäure tropfenweise unter Umschwenken hinzu. Nach 10 Minuten filtriert man den nunmehr reinen Niederschlag durch einen tarierten Gooch-Tiegel und wäscht ihn mit der obigen Waschflüssigkeit aus, bis keine Braunfärbung durch Ferrocyankalium mehr erzeugt wird.

Der Niederschlag wird schwach geblüht, indem man den Gooch-Tiegel in einen Nickeltiegel, auf dessen Boden sich eine ausgeglühte, 2 mm dicke Asbestpappe befindet und der mit einem Uhrglase bedeckt ist, anfangs gelinde und später stärker erhitzt, jedoch nur so stark, daß der Boden des Nickeltiegels nur schwach rotglühend wird. Der gleichmäßig blaugrünschwarze Rückstand von Phosphormolybdänsäureanhydrid ( $24 \text{ MoO}_3 \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ ) wird im bedeckten Tiegel im Exsiccator erkalten gelassen und gewogen. Durch Multiplikation mit 0,03949 erhält man die entsprechende Menge Phosphorsäure ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

Das Verfahren ist rasch ausführbar und liefert sehr gute Ergebnisse.

FINKENER<sup>2</sup> verfährt ähnlich, trocknet aber nur bei  $160^\circ$  und erhält dabei ein gelbes Ammoniumphosphormolybdat,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ MoO}_3$ , das zwar theoretisch 3,784%  $\text{P}_2\text{O}_5$  enthält, aber, mit dem Faktor 0,03794 multipliziert, richtigere Ergebnisse liefert.

$\gamma$ ) Maßanalytische Bestimmung nach A. NEUMANN<sup>3</sup>. Dieses Verfahren wird in der Abänderung von H. KLEINMANN<sup>4</sup>, wie folgt, ausgeführt:

Lösungen, welche bis 10 mg Phosphorsäure enthalten, werden mit Wasser auf 60 ccm verdünnt, 1,5 ccm konz. Schwefelsäure, 15 ccm Ammoniumnitratlösung (190 g zu 300 ccm gelöst) zugesetzt, bis zum Sieden erhitzt und nun die Phosphorsäure durch Zusatz von 5 ccm Ammoniummolybdatlösung (10%) gefällt. Nach Zusatz von 10 ccm absol. Alkohol filtriert man durch ein gehärtetes Filter (Schleicher & Schüll Nr. 589) und wäscht mit 50%igem, durch Eis gekühltem Alkohol aus. Zu dem Niederschlage mitsamt dem Filter werden 11 ccm 0,5 N.-Natronlauge gegeben, etwas Wasser hinzugefügt und bis zum Verschwinden des Ammoniaks gekocht, darauf Phenolphthalein hinzugefügt, mit 0,5 N.-Schwefelsäure angesäuert, die Kohlensäure durch Kochen ausgetrieben, mit 0,5 N.-Natronlauge bis zum Umschlag zurücktitriert und dann die vollständige Entfernung der Kohlensäure durch nochmaliges Ansäuern mit Rücktitrieren festgestellt. Letzteres muß gewöhnlich zwei- bis dreimal wiederholt werden, bis der zugegebenen Säuremenge die gleiche Menge 0,5 N.-Natronlauge beim Zurücktitrieren entspricht. Die zugefügten ccm 0,5 N.-Natronlauge,

<sup>1</sup> Ist weniger als 0,1 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  vorhanden, so können natürlich die Reagensmengen geringer sein, z. B. bei 0,01—0,005 g 15 ccm Ammoniummolybdatlösung, 20 ccm Ammoniumnitratlösung und 10 ccm Salpetersäure.

<sup>2</sup> FINKENER: Zeitschr. analyt. Chem. 1882, **21**, 566.

<sup>3</sup> A. NEUMANN: Zeitschr. physiol. Chem. 1902, **37**, 115; 1905, **43**, 32.

<sup>4</sup> H. KLEINMANN: Biochem. Zeitschr. 1919, **99**, 95.

abzüglich der cem 0,5 N.-Schwefelsäure, mit dem Faktor 0,533 multipliziert, ergeben die vorhandene Menge Phosphor (P) und, mit 1,219 multipliziert, die entsprechende Menge Phosphorsäure ( $P_2O_5$ ).

F. FRODL<sup>1</sup> hat ein entsprechendes jodometrisches Verfahren angegeben.

**b) Bestimmung als Magnesiumpyrophosphat.** Diese Bestimmung kann sowohl nach vorangegangener Ausfällung der Phosphorsäure als Ammoniumphosphormolybdat als auch direkt erfolgen.

$\alpha$ ) Bestimmung nach vorangegangener Ausfällung als Ammoniumphosphormolybdat. Für diese Ausfällung sind die verschiedensten Verfahren angegeben<sup>2</sup>; zuverlässig und schnell ausführbar ist das Verfahren von R. WOX (S. 1259). Das zum zweiten Male ausgefällte und abfiltrierte Ammoniumphosphormolybdat löst man in warmem verd. Ammoniak (2,5%) und versetzt die Lösung so lange mit Salzsäure, bis der entstehende Niederschlag sich nur langsam in der ammoniakalischen Flüssigkeit wieder löst.

Für die nunmehrige Fällung mit Magnesiainmischung sind die verschiedensten Verfahren angegeben, die teils in der Kälte, teils in der Hitze die Phosphorsäure als Magnesium-Ammoniumphosphat ( $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ ) fällen. Die Fällungen in der Kälte liefern unsichere, je nach den Versuchsbedingungen teils zu hohe, teils zu niedrige Ergebnisse<sup>3</sup>. Man fällt am besten nach dem Verfahren von B. SCHMITZ in der Hitze.

Fällung nach B. SCHMITZ<sup>4</sup>. Die klare ammoniakalische Flüssigkeit erhitzt man mit einem Überschuß von saurer Magnesiainmischung zum Sieden und setzt nach Zugabe eines Tropfens Phenolphthalein möglichst schnell unter beständigem Umrühren — am besten aus einer Pipette oder Bürette — verdünntes Ammoniak (etwa 2,5%) bis zur schwachen Rotfärbung hinzu. Darauf läßt man erkalten, fügt  $\frac{1}{5}$  des Flüssigkeitsvolumens konz. Ammoniak hinzu und kann dann schon nach 10 Minuten filtrieren. Hierbei verwendet man am besten einen Platin-GOOCH-Tiegel mit Asbestfilter oder einen NEUBAUER-Tiegel mit Platinschwammfilter, wäscht den Niederschlag mit 2,5%igem Ammoniak aus, trocknet, erhitzt zunächst mit kleiner Flamme, glüht dann im Muffelofen oder vor dem Gebläse bei heller Rotglut und wägt das entstandene weiße<sup>5</sup> Magnesiumpyrophosphat ( $Mg_2P_2O_7$ ). Dieses ergibt, mit 0,6379 multipliziert, die Phosphorsäure ( $P_2O_5$ ).

Saure Magnesiainmischung wird nach B. SCHMITZ durch Lösen von 55 g kryst. Magnesiumchlorid und 105 g Ammoniumchlorid in Wasser zu 1 Liter und Zufügen von ein wenig Salzsäure hergestellt.

$\beta$ ) Direkte Bestimmung.  $\alpha\alpha$ ) Wenn es sich um die Bestimmung der Phosphorsäure in reinen Phosphatlösungen handelt, so kann diese mit Magnesiainmischung in der unter  $\alpha$ ) angegebenen Weise ohne voraufgehende Ausfällung mit Ammoniummolybdat erfolgen.

$\beta\beta$ ) Citratverfahren. Zu 50 cem der salz-, salpeter- oder schwefelsauren Phosphatlösung setzt man 50 cem Ammoniumcitratlösung und darauf 25 cem

<sup>1</sup> F. FRODL: Chem.-Ztg. 1926, 50, 825, 839, 868.

<sup>2</sup> Bei den verschiedenen Verfahren wechselt sowohl die Zusammensetzung der Molybdänlösung und Magnesiainmischung als auch die Art der Fällung, Menge des Ammoniakzusatzes usw. — Vgl. auch die neueren Arbeiten von M. ISHIBASHI (Zeitschr. analyt. Chem. 1931, 84, 264), sowie von J. McCANDLESS und J. BURTON (Ind. Engin. chem. 1924, 16, 1267; C. 1925, I, 1230).

<sup>3</sup> H. NEUBAUER: Zeitschr. angew. Chem. 1896, 439. — F. A. GOOCH: Zeitschr. anorg. Chem. 1899, 20, 135. — K. K. JÄRVINEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1905, 44, 333. — G. JÖRGENSEN: Zeitschr. analyt. Chem. 1906, 44, 278.

<sup>4</sup> B. SCHMITZ: Zeitschr. analyt. Chem. 1906, 45, 512. — Vgl. ferner JÄRVINEN und JÖRGENSEN in Anmerkung 3.

<sup>5</sup> Bei zu raschem Erhitzen bleibt das Magnesiumpyrophosphat durch Spuren von unverbrannter Kohle grau. Um sie zu entfernen, befeuchtet man nach dem Erkalten mit wenig Ammoniumcitratlösung und erhitzt nach dem Trocknen nochmals.

Magnesiamischung hinzu und schüttelt oder rührt die Mischung in einem mechanischen Schüttel- oder Rührwerk  $\frac{1}{2}$  Stunde. Dann wird weiter wie unter  $\alpha$ ) verfahren.

Ammoniumcitratlösung. 100 g Citronensäure werden in etwa 500 ccm Wasser gelöst und zu der kalten Lösung unter Umschütteln — am besten unter Kühlung, damit Ammoniakverluste möglichst vermieden werden — 350 ccm Ammoniakflüssigkeit ( $d = 0,91$ ) langsam hinzugegeben. Dann wird nach dem Erkalten auf 1 Liter aufgefüllt.

Magnesiamischung. 55 g kryst. Magnesiumchlorid und 70 g Ammoniumchlorid werden in 250 ccm 10%iger Ammoniakflüssigkeit ( $d = 0,96$ ) gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.

Dieses sehr schnell ausführbare und einfache Verfahren wird viel zur Untersuchung von Düngemitteln verwendet, und liefert dabei brauchbare Ergebnisse, weil der durch die Mitfällung von etwas Calcium bedingte Fehler durch die geringe Löslichkeit des Magnesiumammoniumphosphats in der Flüssigkeit kompensiert wird. Für die Bestimmung der Phosphorsäure in Lebensmitteln und überhaupt von geringen Mengen Phosphorsäure ist es nicht geeignet.

$\gamma\gamma$ ) Oxalat-citratverfahren. Dieses von J. GROSSFELD<sup>1</sup> beschriebene Verfahren, bei dem durch den Zusatz von Ammoniumoxalat bei dem Citratverfahren nach  $\beta\beta$ ) die störende Wirkung des Calciums verhindert wird, hat anscheinend bis jetzt keine Nachprüfung erfahren.

c) Maßanalytische Bestimmung nach B. PFYL<sup>2</sup>. Über die Grundlage dieses Verfahrens siehe S. 1219. Man verfährt, wie folgt:

25 ccm der Untersuchungsflüssigkeit (nicht mehr als 0,07 g Phosphorsäure enthaltend) titriert man in einem ERLLENMEYER-Kolben mit eingeschliffenen Stopfen nach Zusatz von 4 Tropfen Methyloangelösung mit 0,1 N.-Natronlauge ( $a$  ccm) bis zum Farbumschlag, wobei man sich zweckmäßig einer Vergleichsflüssigkeit aus der entsprechenden Menge Wasser, 4 Tropfen Methyloangelösung und 1 Tropfen 0,1 N.-Natronlauge bedient. Die austitrierte Lösung wird sodann in einem ammoniakfreien Raume mit 30 ccm gegen Phenolphthalein neutraler Calciumchloridlösung (40%) vermischt, bis zum Sieden erhitzt und zu der siedend heißen Lösung so viel 0,1 N.-Natronlauge ( $b$  ccm) hinzugegeben, bis die durch den Calciumchloridzusatz bewirkte Rosafärbung wieder in Orange umschlägt; ist diese Neutralfarbe erreicht und tritt ein Farbumschlag nach Rosa auch nach einigem Warten in der Wärme nicht wieder ein, so wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und die nun wieder gegen Methyloangelösung saure Lösung zuerst gegen Methyloangelösung, dann gegen Phenolphthalein neutralisiert ( $c$  ccm). Dann entspricht die Differenz des Verbrauchs an 0,1 N.-Natronlauge vom ersten Farbumschlag des Methyloangelösung in Gelb ( $a$  ccm) bis zur endgültigen Rotfärbung des Phenolphthaleins ( $b + c$  ccm), also  $a - (b + c)$  dem Gehalt an Phosphorsäure. 1 ccm 0,1 N.-Natronlauge entspricht hierbei 4,752 mg  $PO_4^{''}$  oder 3,552 mg  $P_2O_5$ .

d) Colorimetrische Bestimmung mit Molybdänblau. Die Molybdänblaulösung entfärbt sich beim Verdünnen mit Wasser; bei Anwesenheit von Phosphorsäure (auch von Arsensäure) erscheint jedoch die Färbung allmählich wieder und ihre Stärke ist dem Gehalte an Phosphorsäure (oder Arsensäure) proportional. Sie wird mit einem Colorimeter gemessen.

Darstellung der Molybdänblaulösung von R. ZINZADZE<sup>3</sup>. Man verreibt 3 g reines, gepulvertes Molybdäntrioxid (für Glühfäden von Kahlbaum) in einem Porzellanmörser mit etwas reiner konz. Schwefelsäure ( $d = 1,48$ ). Die sehr feine Aufschwemmung wird mit konz. Schwefelsäure in einen KJELDAHL-Kolben gespült. Für das Anreiben und Überspülen sollen genau 50 ccm konz. Schwefelsäure verbraucht werden. Man erhitzt den Kolben unter Umschütteln über freier Flamme, wobei sich das Trioxid leicht löst. Nach völligem Abkühlen gießt man die Lösung in 50 ccm Wasser. Zu der noch heißen Lösung gibt man 0,15 g reines pulverförmiges Molybdänmetall (Kahlbaum) hinzu und erhitzt

<sup>1</sup> J. GROSSFELD: Zeitschr. analyt. Chem. 1918, 57, 28.

<sup>2</sup> B. PFYL: Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amt 1914, 47, 1; Z. 1922, 43, 313. — B. PFYL u. W. SAMTER: Z. 1923, 46, 241.

<sup>3</sup> R. ZINZADZE: Zeitschr. Pflanzenernährung A 1930, 16, 129.

1—2 Minuten zum Sieden, wobei das Trioxyd zu blauem Dioxid reduziert wird. Nach 10 Minuten wird die blaue Flüssigkeit von den Metallresten durch einen Glasfiltertiegel G 3 abgesaugt. Nunmehr wird die Reduktionskraft der Molybdänblaulösung in folgender Weise geprüft: In ein 10 ccm-ERLENMEYER-Kölbchen gibt man 0,2 ccm N.-Permanganatlösung und läßt aus einer geeichten 5 ccm-Meßpipette, die in 0,01 ccm geteilt ist, so lange Molybdänblaulösung hinzutropfen, bis der Inhalt des Kölbchens gerade farblos geworden ist. Da die Molybdänblaulösung schließlich so eingestellt sein muß, daß 0,2 ccm N.-Permanganatlösung 2,5 ccm Molybdänblaulösung entsprechen, so muß bei dieser Titration ein Wert für die Molybdänblaulösung gefunden werden, der kleiner ist als 2,5. Wird er größer gefunden als 2,5, so muß die Lösung unter Zusatz von Molybdänmetall abermals aufgekocht werden usw., bis schließlich ein kleinerer Faktor gefunden wird.

Angenommen, man habe die Reduktionskraft der Molybdänblaulösung zu  $a$  ccm ermittelt ( $a$  kleiner als 2,5), so wird der Verdünnungsgrad folgendermaßen berechnet:

$$100 : a = x : 2,5, \text{ woraus sich ergibt: } x = \frac{250}{a}.$$

Da man 100 ccm Molybdänblaulösung nicht mehr zur Verfügung hat, sondern nur  $b$  ccm, wobei also  $b$  kleiner als 100 ist, so hat man noch umzurechnen:

$$100 : x = b : z, \text{ also } z = \frac{b \cdot x}{100} = \frac{b \cdot 250}{a \cdot 100} = \frac{2,5 \cdot b}{a}.$$

$$\text{Ist also z. B. } a = 1,5 \text{ und } b = 90, \text{ so ist } z = \frac{2,5 \cdot 90}{1,5} = 150 \text{ ccm.}$$

In diesem Beispiel also wären 90 ccm der Molybdänblaulösung auf 150 ccm zu verdünnen. Zur Verdünnung darf nicht Wasser genommen werden, sondern es muß dazu eine Lösung von Molybdäntrioxyd in Schwefelsäure benutzt werden (3 g Molybdäntrioxyd + 50 ccm Schwefelsäure + 50 ccm Wasser), wie sie oben zur Herstellung der Molybdänblaulösung selbst diente.

Zum colorimetrischen Vergleich benutzt man folgende Phosphatstandardlösungen:

1. 1,4326 g reinstes primäres Kaliumphosphat (nach SÖRENSEN) löst man zu 1 Liter auf. 1 ccm dieser Lösung enthält 1 mg  $\text{PO}_4 = 0,7474$  mg  $\text{P}_2\text{O}_5$ .
2. Von dieser ersten Lösung verdünnt man 50 ccm zu 500 ccm, so daß 1 ccm dieser Lösung 0,1 mg  $\text{PO}_4$  enthält.

**Ausführung der Bestimmung nach C. v. D. HEIDE und K. HENNIG<sup>1</sup>.**  
Die Asche von etwa 0,1—0,5 g Substanz löst man in wenigen Tropfen verd. Schwefelsäure und spült die Lösung mit heißem Wasser in ein 100 ccm-Kölbchen über. Dann versetzt man mit 1,4 ccm der Molybdänblaulösung, füllt mit siedend heißem Wasser bis zu Marke auf, läßt abkühlen, stellt endgültig auf die Marke ein und colorimetriert. Zum Vergleich gibt man von der Phosphatstandardlösung (0,1 mg  $\text{PO}_4$  in 1 ccm) in je einen 100 ccm-Meßkolben 1, 3 und 5 ccm, fügt je 1,4 ccm der eingestellten Molybdänblaulösung hinzu und füllt mit siedend heißem Wasser auf. Etwa 20—30 Minuten nach Zugabe des kochenden Wassers haben die Färbungen ihren Höhepunkt erreicht und behalten ihn tagelang unverändert bei.

H. KLEINMANN<sup>2</sup> hat für die colorimetrische Bestimmung die Molybdän-Rotverbindung empfohlen, die mit Kaliumferrocyanid erhalten wird.

e) **Mikroverfahren.**  $\alpha$ ) Als Ammoniumphosphormolybdat nach den oben (S. 1258) angegebenen Verfahren kann die Phosphorsäure nach PRÉGL und H. LIEB<sup>3</sup> auch mikrochemisch bestimmt werden.

$\beta$ ) Nach H. KLEINMANN. Das Verfahren ist das gleiche wie bei der Makrobestimmung (S. 1260). Zu 10 ccm Phosphorsäurelösung gibt man 1 ccm konz. Schwefelsäure und 6 ccm Ammoniummolybdatlösung (10%) hinzu. Darauf setzt man 2 ccm absol. Alkohol hinzu und verfährt wie oben angegeben. Zweckmäßig kocht man jedoch das Filter nicht mit der Lauge aus, sondern löst den Niederschlag auf dem Filter, indem man die abgemessene Menge Lauge tropfenweise auf das Filter fallen läßt und darauf sorgfältig mit Wasser nachwäscht.

<sup>1</sup> C. v. D. HEIDE u. K. HENNIG: Z. 1933, 66, 344. — Vergl. auch G. DENIGÈS: Mikrochemie 1929, 27.

<sup>2</sup> H. KLEINMANN: Biochem. Zeitschr. 1919, 99, 45.

<sup>3</sup> H. LIEB: ABDERHALDEN'S Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 3, S. 384.



Die angewandten Lösungen sind die gleichen wie beim Makroverfahren, nur werden an Stelle der 0,5 N.-Natronlauge und Schwefelsäure 0,05 N.-Lösungen verwandt, die durch Verdünnung der genau eingestellten 0,5 N.-Lösungen hergestellt werden. Geringere Mengen als 1 mg  $P_2O_5$  können auf diese Weise nicht bestimmt werden.

K. SAMSON<sup>1</sup> sowie J. BODNÁR und L. BARTA<sup>2</sup> haben ähnliche Abänderungen des Verfahrens von A. NEUMANN beschrieben.

γ) Colorimetrische Bestimmung nach Y. TERADA<sup>3</sup>. Das Verfahren beruht auf der Fällung der Phosphorsäure mit Strychnin-molybdänreagens, Zusatz von Phenylhydrazin zu der Lösung des Niederschlags und Vergleichen der weinroten Farbe mit einer Vergleichslösung. Die Änderung der Farbtiefe ist proportional der Konzentration der Phosphorsäurelösung. Das Verfahren liefert bei Werten von 0,06—0,2 mg  $P_2O_5$  gute Werte.

δ) Nephelometrische Bestimmung. Ein solches Verfahren hat H. KLEINMANN<sup>4</sup> vorgeschlagen. Es zeigt Mengen von 0,1—0,0005 mg Phosphorsäure ( $P_2O_5$ ) an und übertrifft in seiner Genauigkeit die anderen Mikromethoden, die mit größeren Substanzmengen arbeiten. Es wird als Nephelometer eine Abänderung des kleinen Colorimeters von Schmidt & Haensch (S. 407) empfohlen. Ausgezeichnete Ergebnisse (Meßgenauigkeit 1—0,5%) wurden mit dem Strychnin-Molybdänreagens erhalten. Acetate, Carbonate und Nitrite müssen vorher entfernt werden.

f) Sonstige Verfahren. Es ist für die Bestimmung der Phosphorsäure noch eine große Zahl anderer Verfahren vorgeschlagen, z. B. als Uranylphosphat<sup>5</sup>, als Silberphosphat<sup>6</sup>, als Vanadinphosphorsäure-Molybdat<sup>7</sup> usw. Eine ausführliche Zusammenstellung dieser Verfahren hat H. KLEINMANN<sup>8</sup> gegeben.

## 7. Borsäure.

Borsäure kommt in geringen Mengen in natürlichen pflanzlichen Lebensmitteln und in etwas größeren in manchen Mineralwässern vor; sie findet ferner als Konservierungsmittel vorwiegend bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs Verwendung.

Die Borsäure (Orthoborsäure,  $H_3BO_3$ ) kristallisiert in farblosen, perlmutterglänzenden Schuppen, die in Wasser leicht löslich sind (100 Tle. Wasser lösen bei 15° 4 Tle. und bei 100° 33 Tle. Borsäure), sich ferner auch in Alkohol (100 Tle. Alkohol von 90 Vol.-% lösen 4 Tle.) und in geringen Mengen in Äther lösen (S. 1267). Beim Erhitzen auf 100° geht die Borsäure in Metaborsäure ( $HBO_2$ ), auf 160° in Pyroborsäure ( $H_2B_4O_7$ ) und beim Glühen in Borsäureanhydrid (Bortrioxyd),  $B_2O_3$ , über.

Die Salze der Borsäure leiten sich von der Meta- und Pyroborsäure ab. Die Alkalisalze sind mit alkalischer Reaktion in Wasser löslich; die übrigen Borate sind in Wasser schwer löslich, aber leicht löslich in Säuren und Ammoniumchlorid.

Über die physiologische Wirkung der Borsäure und ihrer Salze siehe Bd. I, S. 1002.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an Borsäure folgende Reinheitsanforderungen:

Die wäßrige Lösung (1 + 49) darf weder durch 3 Tropfen Natriumsulfidlösung (Schwermetallsalze) noch durch Bariumnitratlösung (Schwefelsäure) oder Silbernitratlösung (Salzsäure), noch nach Zusatz von Ammoniakflüssigkeit durch Natriumphosphatlösung (Calcium-, Magnesiumsalze) verändert werden; nach Zusatz einiger Tropfen Salzsäure darf die Lösung durch 0,5 ccm Kaliumferrocyanidlösung nicht sofort gebläut werden (Eisensalze). Wird

<sup>1</sup> K. SAMSON: Biochem. Zeitschr. 1925, 164, 288; 1929, 208, 230.

<sup>2</sup> J. BODNÁR u. L. BARTA: Biochem. Zeitschr. 1930, 227, 429.

<sup>3</sup> Y. TERADA: Biochem. Zeitschr. 1924, 145, 426. — Vgl. auch H. KLEINMANN: Biochem. Zeitschr. 1919, 99, 150.

<sup>4</sup> H. KLEINMANN: Biochem. Zeitschr. 1919, 99, 150.

<sup>5</sup> VON PINCUS. Vgl. auch A. SATO: Journ. Biol. Chem. 1918, 35, 473; C. 1919, II, 327.

<sup>6</sup> P. v. LIEBERMANN: Biochem. Zeitschr. 1909, 18, 44. — W. R. BLOOR: Journ. Biol. Chem. 1915, 22, 133.

<sup>7</sup> G. MISSON: Chem.-Ztg. 1908, 32, 633.

<sup>8</sup> H. KLEINMANN: Biochem. Zeitschr. 1919, 99, 19, 45, 95, 115, 150.

ein Gemisch von 0,5 g Borsäure und 2 ccm Schwefelsäure mit 1 ccm Ferrosulfatlösung überschichtet, so darf sich zwischen den beiden Flüssigkeiten keine gefärbte Zone bilden (Salpetersäure, Salpetrige Säure).

Das Arzneibuch stellt auch Reinheitsanforderungen an Borax, die denen an Borsäure ähnlich sind. Borax darf ferner in der wäßrigen Lösung (1 + 49) nach dem Ansäuern keine Kohlensäure entwickeln und keine Phosphorsäure enthalten. Ein Gemisch von 0,2 g Borax und 3 ccm Natriumhypophosphitlösung (20%ige salzsaure Lösung) darf nach  $\frac{1}{4}$ stündigem Erhitzen im siedenden Wasserbade keine dunklere Färbung annehmen (Arsenverbindungen).

**a) Nachweis.**  $\alpha$ ) Reaktion mit konz. Schwefelsäure und Alkohol. Versetzt man die Asche eines Lebensmittels mit Alkohol (am besten Methylalkohol) und dann mit konz. Schwefelsäure, rührt um und zündet den Alkohol an, so verbrennt dieser mit grünesäumter Flamme unter Bildung von Borsäureäthyl- bzw. -methylester  $[B(O \cdot CH_3)_3]$ .

Empfindlicher ist der Nachweis bei folgendem Verfahren: Die Asche wird mit einem erkalteten Gemisch von 5 ccm Methylalkohol und 0,5 ccm konz. Schwefelsäure sorgfältig zerrieben und unter Benutzung weiterer 5 ccm Methylalkohol in einem verschlossenen 100 ccm-ERLENMEYER-Kolben unter mehrmaligem Umschütteln  $\frac{1}{2}$  Stunde lang stehen gelassen. Darauf wird der Methylalkohol aus einem Wasserbade von 80—85° vollständig in ein Gläschen von etwa 40 ccm Inhalt und etwa 6 cm Höhe abdestilliert. Das Gläschen wird mit einem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen, durch den 2 Rohre hindurchführen, von denen das eine, bis auf den Boden des Gläschens reichende Rohr zur Einleitung von getrocknetem Wasserstoff dient, während das andere, nur bis in den Hals des Gefäßes reichende, außen verjüngte Rohr mit einer Platinspitze (aus Platinblech hergestellt) zur Ausführung des Gases dient. Bei Gegenwart von Borsäure ist die angezündete, 2—3 cm lange Flamme grün gefärbt. Man beobachtet die Färbung in zerstreutem Tageslicht.

$\beta$ ) Curcumin-Reaktion. Man gibt in eine Porzellanschale die auf Borsäure zu prüfende Asche, dazu 2—3 Tropfen alkoholische Curcuminlösung, säuert mit Salzsäure an und verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne. Bei Gegenwart von 0,02 mg Borsäureanhydrid färbt sich der Rückstand rotbraun; auch 0,002 mg geben eine noch eben sichtbare Reaktion.

Meist führt man die Reaktion mit Curcuminpapier aus, indem man in die salzsaure Lösung der Asche einen Streifen geglättetes Curcuminpapier eintaucht, dieses auf einem Uhrglase bei 60—70° trocknet. Bei Gegenwart von Borsäure zeigt das Curcuminpapier eine rötliche bis orangerote Färbung, die beim Betupfen mit einer 2%igen Lösung von Natriumcarbonat (wasserfrei) je nach der Borsäuremenge in Blauviolett bis Blauschwarz übergeht. Bei Abwesenheit von Borsäure wird die gelbe Farbe des Curcuminpapiers nicht verändert und durch Natriumcarbonatlösung rotbraun gefärbt.

Darstellung von Curcuminpapier. Das Curcumin wird in der Weise hergestellt, daß man 30 g bei 100° getrocknetes Curcumawurzelpulver (von *Curcuma longa*) im SOXHLET-schen Extraktionsapparat zunächst 4 Stunden mit Petroläther auszieht und das so entfettete und getrocknete Pulver alsdann im gleichen Apparat 8—10 Stunden mit 100 ccm heißem Benzol erschöpft, wobei man zum Erhitzen des Benzols ein Glycerinbad von 115—120° verwendet. Beim Erkalten der Benzollösung scheidet sich innerhalb 12 Stunden das Curcumin ab. — Das Curcuminpapier wird durch einmaliges Tränken von glattem, weißem Filtrierpapier mit einer Lösung von 0,1 g Curcumin in 100 ccm Alkohol (90%) hergestellt. Das Curcuminpapier ist nach dem Trocknen in gut verschlossenen Gefäßen vor Licht geschützt aufzubewahren.

**b) Bestimmung.** Sie erfolgt am besten in der unter alkalischen Zusätzen hergestellten Asche (S. 1220). Hierbei ist jedoch zu beachten, daß bei der Veraschung fettreicher Substanzen Verluste an Borsäure eintreten.

Nach den Untersuchungen von A. SCOTT-DODD<sup>1</sup> ist der Grund für diesen störenden Einfluß des Fettes im Glycerin Gehalt zu suchen, dadurch bedingt, daß sich wahrscheinlich bei der Veraschung flüchtige Glycerinborate bilden. Die verschiedenen Fette verursachen konstante, untereinander aber abweichende Borsäureverluste. In Pflanzenprodukten, die 8% und mehr Fett enthalten, treten beim Veraschen erhebliche Borsäureverluste auf. Um solche zu vermeiden, verfährt man nach A. SCOTT-DODD in der Weise, daß man die

<sup>1</sup> A. SCOTT-DODD: Analyst 1929, 54, 715; 1930, 55, 23.

mit Natronlauge deutlich alkalisch gemachte Probe im Trockenschranke trocknet, ihr Pulver nach und nach mit Petroläther verreibt und den durch ein Filter filtrierten Petroläther in einem Scheidetrichter zuerst mit 5 ccm N.-Natronlauge und dann mit 5—6 ccm Wasser wäscht. Die Natronlauge und die Waschflüssigkeit werden dann in der Platinschale nach Zusatz von weiteren 5 ccm N.-Natronlauge zur Trockne verdampft und mit dem extrahierten Pulver nach dem Auslaageverfahren verascht. Dann geschieht die Bestimmung in der Asche nach den folgenden Verfahren.

Die einfachsten und heute am meisten angewandten Verfahren<sup>1</sup> sind folgende:

α) Acidimetrisches Verfahren. Es beruht auf der Eigenschaft der Borsäure, in neutralisierten wäßrigen Lösungen mit mehrwertigen Alkoholen relativ starke Estersäuren (Glycerin-, Mannitborsäure) zu bilden, die einwertig sind und acidimetrisch bestimmt werden können. An mehrwertigen Alkoholen wurde anfangs Glycerin und später Mannit<sup>2</sup> verwendet.

Ferner sind als Aktivatoren der Borsäure wirksam Glucose und Fructose (Invertzucker), Arabinose, Galaktose, Erythrit, Arabit, Dulcitol, Sorbit usw., nicht aber Inosit, Quercitol, Saccharose usw.

Das Verfahren wurde namentlich von G. JOERGENSEN<sup>3</sup> in die Lebensmittelanalyse eingeführt.

Ausführung. In Anlehnung an das Verfahren von G. JOERGENSEN und die Bestimmung nach A. BEYTHIEN und H. HEMPEL<sup>4</sup> führt man diese, wie folgt, aus:

Man nimmt die mit alkalischen Zusätzen nach dem Auslaageverfahren hergestellte Asche (z. B. von 50 g Fleisch) mit verd. Schwefelsäure auf, erwärmt zur Vertreibung der Kohlensäure einige Zeit in einem mit einem Uhrglase bedeckten ERLÉNMEYER-Kolben auf etwa 60° — oder kocht kurze Zeit am Rückflußkühler — und neutralisiert die abgekühlte Lösung mit 0,1 N.-Natronlauge genau gegen Phenolphthalein. Zu der etwa 50 ccm betragenden Flüssigkeit setzt man 25 ccm Glycerin oder 1—2 g Mannitpulver und titriert ohne Rücksicht auf etwa ausfallende Phosphate — je nach der Menge der vorhandenen Borsäure — mit 0,1 oder 0,5 N.-Natronlauge bis zur schwachen Rotfärbung. Zur scharfen Erkennung des Umschlages leistet ein Zusatz von neutralem Alkohol gute Dienste. 1 ccm 0,1 N.-Natronlauge entspricht etwa 6,2 mg Borsäure ( $H_3BO_3$ ) und 3,5 mg Borsäureanhydrid ( $B_2O_3$ ). Für die genaue Bestimmung stellt man eine Lösung von 2 g und eine zweite von 8 g reiner Borsäure in kohlenstoffreiem Wasser zu 1 Liter her und nimmt davon so viel, wie der in dem Vorversuche ermittelten Borsäuremenge entspricht. Hatte man in diesem z. B. 0,1 g Borsäure gefunden, so nimmt man 50 ccm der ersten Lösung, hatte man 0,2 g gefunden, so verdünnt man 25 ccm der zweiten Lösung zu 50 ccm und verfährt dann genau wie oben. Nach den dabei z. B. für 0,1 g Borsäure verbrauchten ccm 0,1 N.-Natronlauge berechnet man den genauen Borsäuregehalt und findet dabei z. B. den Wirkungswert von 6,3—6,5 mg für 1 ccm 0,1 N.-Natronlauge.

Im einzelnen ist für die Bestimmung noch folgendes zu bemerken:

1. Selbstverständlich müssen Glycerin, Mannit und Alkohol genau neutral sein bzw. neutralisiert werden. Natronlauge und Wasser müssen kohlenstofffrei sein.

2. Wenn man bei beiden Titrationen Phenolphthalein als Indicator verwendet, so stört die Gegenwart von Phosphor- und Kieselsäure nicht. Verwendet man zur ersten Neutralisation zunächst Methylorange und dann Phenolphthalein und bei der zweiten

<sup>1</sup> Eine eingehende Zusammenstellung der älteren Literatur gibt K. WINDISCH: *Z.* 1905, **9**, 641.

<sup>2</sup> VADAM: *Journ. Pharm. et Chim.* 1898, **8**, 109; *C.* 1898, **II**, 678.

<sup>3</sup> G. JOERGENSEN: *Nordisk farmaceutik Tidsskrift* 1895, 213; *Zeitschr. angew. Chem.* 1897, 5.

<sup>4</sup> A. BEYTHIEN u. H. HEMPEL: *Z.* 1899, **2**, 842 und A. BEYTHIEN: *Laboratoriumsbuch für Nahrungsmittelchemiker*, S. 20. Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopff 1931

Neutralisation ebenfalls Phenolphthalein, so kann mit der Borsäurebestimmung auch gleichzeitig die Phosphorsäure bestimmt werden (S. 1219, 1262).

3. Zur Verhinderung der durch Phosphate eintretenden Trübung und der Ausfällung von Calciumcarbonat bei kalkreichen Aschen wird von anderer Seite<sup>1</sup> vor dem Zusatz von Glycerin bzw. Mannit ein Zusatz von 5—10 ccm oder noch mehr neutraler Natriumcitratlösung empfohlen.

4. Von anderer Seite ist die Aufnahme der Asche mit Salzsäure und die Titration mit Barytlauge empfohlen.

5. W. M. DEERNS<sup>2</sup> weist darauf hin, daß bei der Bestimmung keine borsäurehaltigen Glassorten verwendet werden dürfen.

$\beta$ ) Gewichtsanalytische Bestimmung nach A. PARTHEIL und J. ROSE<sup>3</sup>. Das Verfahren beruht auf der Löslichkeit der Borsäure in Äther; 100 g wasserfreier Äther lösen 0,008, wasserhaltiger 0,188 g Borsäure. Man extrahiert sie mittels eines Perforators (Abb. 11, S. 1322) aus salzsaurer Lösung. Diese muß frei von Schwefel-, Salpeter-, Phosphor- und Arseniger Säure, ferner von größeren Mengen Eisen sein.

Sind diese störenden Stoffe vorhanden, so müssen sie vorher entfernt werden: Schwefelsäure durch Bariumchlorid, Salpetersäure durch Glühen des alkalischen Verdampfungsrückstandes, Phosphorsäure durch Fällung als Ferriphosphat, größere Mengen von Eisen durch Zusatz berechneter Mengen von Kaliumferrocyanid usw.

Der mit Natriumcarbonat versetzte Trockenrückstand der Substanz wird zuerst mit kleiner Flamme verkohlt, dann weiß gebrannt, die Asche mit Wasser aufgenommen und das Filtrat mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Zur Abscheidung von Phosphorsäure werden einige Tropfen Eisenchloridlösung hinzugefügt und mit Alkalilauge das überschüssige Eisen ausgefällt. Die Flüssigkeit wird nun auf dem Wasserbade erwärmt, der Niederschlag abfiltriert und mit heißem Wasser gut ausgewaschen. Das alkalische Filtrat wird sodann auf dem Wasserbade auf etwa 10—15 ccm eingedampft, nach dem Erkalten mit Salzsäure angesäuert und nun mit Äther 18 Stunden perforiert. Darauf setzt man ein zweites gewogenes Kölbchen unter und überzeugt sich durch nochmalige etwa zweistündige Perforation von der vollständigen Ausziehung der Borsäure. Das Kölbchen wird in einen Glockenexsiccator über Schwefelsäure gebracht, der außerdem ein Schälchen mit gebranntem Kalk enthält, der Äther bei einem Vakuum von 12—15 mm abgesaugt, die zurückbleibende Borsäure bis zum beständigen Gewicht getrocknet und als  $H_3BO_3$  gewogen.

$\gamma$ ) Colorimetrische Bestimmung kleiner Borsäuremengen nach A. HEBEBRAND<sup>4</sup>. Die mit Zusatz von Calciumacetat<sup>5</sup> (S. 1220) hergestellte kohlefreie Asche löst man in möglichst wenig Salzsäure, macht darauf zur Entfernung des störend wirkenden Eisens mit reinsten Natronlauge<sup>5</sup> schwach, aber deutlich alkalisch, kocht das Gemisch, filtriert und wäscht den Niederschlag mit kochendem Wasser aus. Das Filtrat dampft man ein und nimmt den Rückstand mit 5 ccm verd. Salzsäure auf. Die Lösung wird in ein Reagensglas oder besser in das für diese Zwecke eingerichtete Röhrchen (Abb. 10) bis zur Marke 5 gegeben. Man fügt dann unter Nachspülen der Platinschale absol. Alkohol bis zur Marke

<sup>1</sup> I. M. KOLTHOFF: Chem. Weekbl. 1922, 19, 449; C. 1923, II, 605. — Vgl. auch die Amtliche Anweisung zur chemischen Untersuchung des Weines vom 9. Dezember 1920. Zentralbl. f. d. Deutsche Reich 1920, 48, 1601; Gesetze und Verordnungen, betreffend Nahrungs- und Genußmittel 1921, 13, 130.

<sup>2</sup> W. M. DEERNS: Chem. Weekbl. 1922, 19, 397; C. 1923, II, 604.

<sup>3</sup> A. PARTHEIL u. J. ROSE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1901, 34, 3611; Z. 1902, 5, 1049.

<sup>4</sup> A. HEBEBRAND: Z. 1902, 5, 55, 721, 1044.

<sup>5</sup> Die verwendeten Reagenzien müssen natürlich frei von Borsäure sein. Mit „Alkohol gereinigtes Natriumhydroxyd“ zweier Firmen enthielt z. B. in 100 g 5—7 mg, reinstes, aus Natrium hergestelltes, 1 mg Borsäure.

20 hinzu und darauf bis zur Marke 35 konz. Salzsäure ( $d = 1,19$ ), läßt abkühlen und fügt dann genau 0,2 ccm wäßrige Curcuminlösung (0,1%) hinzu.

Nach dem Umschütteln und etwa  $\frac{1}{2}$ stündigem Stehenlassen im Dunkeln vergleicht man die eingetretene Färbung mit einer Farbenskala, welche man sich unter Anwendung bestimmter Mengen (etwa 0,2—1,2 ccm) einer 1%igen Borsäurelösung unter genauer Einhaltung der vorstehenden Arbeitsweise hergestellt hat. Ist keine Borsäure vorhanden, so färbt sich die Flüssigkeit grünlichgelb; bei Gegenwart von Borsäure dagegen erscheint sie schwach bräunlich (0,1 mg)

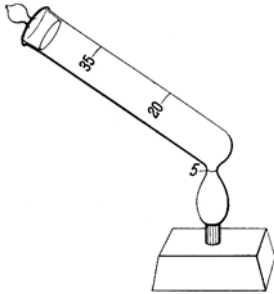


Abb. 10. Röhrchen zur Borsäurebestimmung nach HEBBEBRAND.

bis schön rosenrot (10 mg). Am deutlichsten sind die Unterschiede der Farbentöne bei Gegenwart von 1—5 mg Borsäure. Zur Vergleichung der Farbentöne empfiehlt es sich, das Reagensröhrchen schräg gegen eine weiße Unterlage zu halten, was bei dem nebenstehenden Röhrchen erleichtert wird, in dessen unterstem Teile sich die aus dem Gemisch etwa abgetrennten Salze (Natriumchlorid usw.) ansammeln und so die Vergleichung der Farbentöne erleichtern.

δ) Sonstige Verfahren. Das früher gebräuchliche Verfahren zur Bestimmung der Borsäure von TH. ROSENBLADT<sup>1</sup> und F. A. GOOCH<sup>2</sup>, bei dem die Borsäure aus saurer Lösung mit Methylalkohol destilliert wird, dadurch als Borsäuremethylester  $[B(OHC_2)_3]$  bei 65° übergeht und mit Calcium- oder Magnesiumoxyd verseift und gebunden wird, liefert zwar brauchbare Ergebnisse, ist aber in der Ausführung sehr umständlich und wird daher heute wohl in der Praxis nicht mehr verwendet. Immerhin kann die Destillation mit Methylalkohol aber dazu dienen, um die Borsäure von bei der Bestimmung nach  $\alpha$ ) und  $\beta$ ) störenden Substanzen zu trennen.

Das von J. J. BERZELIUS<sup>3</sup> herrührende Verfahren, die Borsäure als Borfluorkalium ( $KBF_4$ ) zu bestimmen, wurde früher auch bei der Untersuchung von Lebensmitteln angewendet, es wird aber heute wegen seiner Umständlichkeit wohl auch nicht mehr verwendet.

Über die Ausführung dieser beiden und sonstiger Verfahren zur Bestimmung von Borsäure sei auf die Zusammenstellung von K. WINDISCH<sup>4</sup> verwiesen.

## Anhang.

### 8. Wasserstoffsperoxyd.

Wasserstoffsperoxyd findet sich in sehr geringen Mengen in der Luft sowie im Regen und im Schnee. Es findet als Konservierungsmittel für Lebensmittel und Desinfektionsmittel Verwendung.

Über seine physiologische Wirkung siehe Bd. I, S. 1014.

Wasserstoffsperoxyd (Hydroperoxyd),  $H_2O_2$ , ist eine sirupöse, bitter schmeckende, ätzende, stark oxydierend wirkende, in dicker Schicht blaue Flüssigkeit vom Spezifischen Gewicht 1,5, mit Wasser, Alkohol und Äther in jedem Verhältnis mischbar. Die wäßrige Lösung reagiert sauer und ist eine schwache Säure, deren Salze als Perhydrole oder Peroxyde bezeichnet werden. Wasserstoffsperoxydlösungen zersetzen sich, namentlich in alkalischer Lösung, allmählich unter Abspaltung von Sauerstoff, schneller bei Gegenwart von Staub und besonders von Kontaktsubstanzen (kolloidale Metalle), wenn sie alkalisch sind. Wasserstoffsperoxyd kommt in wäßriger Lösung von 3 Gew.-%  $H_2O_2$  und in 30 Gew.-%iger Lösung als Perhydrolyl in den Handel.

Das Deutsche Arzneibuch VI (1926) stellt an konzentrierte Wasserstoffsperoxydlösung (mindestens 30 Gew.-%  $H_2O_2$  enthaltend) folgende Reinheitsanforderungen:

<sup>1</sup> TH. ROSENBLADT: Zeitschr. analyt. Chem. 1887, **26**, 18.

<sup>2</sup> F. A. GOOCH: Amer. Chem. Journ. 1887, **9**, 23; Zeitschr. analyt. Chem. 1887, **26**, 364.

<sup>3</sup> J. J. BERZELIUS: Jahresber. Chemie u. Physik 1828, **2**, 364.

<sup>4</sup> K. WINDISCH: Z. 1905, **9**, 641.

Die wäßrige Lösung (1 + 9) darf weder durch verd. Schwefelsäure (Bariumsalze) innerhalb 10 Minuten, noch nach Zusatz von 1 ccm verd. Essigsäure und 0,5 ccm Natriumacetatlösung durch 0,5 ccm Calciumchloridlösung (Oxalsäure) verändert werden; nach Zusatz von 1 ccm Salpetersäure darf sie durch Silbernitratlösung höchstens opalisierend getrübt werden. 5 ccm konz. Wasserstoffsuperoxydlösung dürfen nach dem Verdünnen mit 45 ccm Wasser zur Neutralisation höchstens 2 ccm 0,1 N.-Kalilauge verbrauchen, Phenolphthalein als Indicator (unzulässige Menge freie Säure). — 10 ccm konz. Wasserstoffsuperoxydlösung dürfen nach dem Verdampfen auf dem Wasserbade höchstens 0,03 g Rückstand hinterlassen; wird der Rückstand gegläht, so darf sein Gewicht höchstens 0,005 g betragen. — 5 ccm konz. Wasserstoffsuperoxydlösung werden in einem Porzellantiegel auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit 2 ccm Natriumhypophosphitlösung (20%ige salzsaure Lösung) übergossen und  $\frac{1}{4}$  Stunde lang bei aufgedecktem Uhrglas auf dem Wasserbade erhitzt. Hierbei darf keine bräunliche Färbung eintreten (Arsenverbindungen).

An die 3—3,2%ige Wasserstoffsuperoxydlösung des Arzneibuches werden ähnliche Anforderungen wie an die 1 + 9 verdünnte Lösung der konz. Wasserstoffsuperoxydlösung gestellt. Ferner darf sie zur Neutralisation höchstens 3 ccm 0,1 N.-Kalilauge verbrauchen. — 10 ccm dürfen nach dem Verdampfen höchstens 0,015 g Rückstand hinterlassen.

#### a) Nachweis.

Zum Nachweis des Wasserstoffsuperoxydes ist eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen worden, die sämtlich auf der Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch Metallsalze beruhen.

$\alpha$ ) Nachweis durch Chromsäure. Überschichtet man die zu prüfende Flüssigkeit mit einem gleichen Volumen von alkoholfreiem Äther und gibt einen Tropfen Chromsäurelösung (10%) hinzu, so färbt sich der Äther nach dem Schütteln bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd durch Chromperoxyd blau.

$\beta$ ) Nachweis durch Ammoniummolybdat. Man versetzt die zu prüfende Flüssigkeit mit 3—4 ccm Ammoniummolybdatlösung (10%) und gibt einige Tropfen Citronensäurelösung hinzu. Ist Wasserstoffsuperoxyd zugegen, so färbt sich die Flüssigkeit gelb.

Diese Gelbfärbung der Ammoniummolybdatlösung ist nach N. W. MATTHEWS<sup>1</sup> empfindlicher als die durch Phosphorsäure.

$\gamma$ ) Nachweis durch Eisenammoniumsulfatlösung. Nach N. W. MATTHEWS<sup>1</sup> werden zu 2 ccm Weinsäurelösung (5%) 2 Tropfen Eisenammoniumsulfatlösung (5%) zugegeben; nach Zusatz einer Wasserstoffsuperoxyd enthaltenden Lösung und 5—6 Tropfen Natronlauge entsteht Violettfärbung.

$\delta$ ) Nachweis durch Titansäurelösung. Nach A. RICHARDSON<sup>2</sup> gibt Wasserstoffsuperoxyd mit Titansäurelösung eine Gelbfärbung. Diese durch Per Titansäure ( $\text{TiO}_3$ ) hervorgerufene Gelbfärbung kann auch zur colorimetrischen Bestimmung benutzt werden.

Zur Darstellung der Titansäurelösung kocht man Titandioxyd ( $\text{TiO}_2$ ) mit starker Schwefelsäure, verdünnt, filtriert, fällt das Filtrat durch Ammoniak und löst den gut ausgewaschenen Niederschlag in kalter verd. Schwefelsäure.

$\epsilon$ ) Nachweis durch Eisensulfat- und Kaliumcyanidlösung. Nach A. ROGAI<sup>3</sup> mischt man in einem Reagensglase je 2—3 Tropfen frisch bereiteter Ferrosulfatlösung und Kaliumcyanidlösung, gibt 5—6 ccm Äther hinzu und schüttelt um. Versetzt man hierauf vorsichtig mit der zur prüfenden Lösung, so nimmt der Äther bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd, je nach dessen Menge, eine hellrote bis blutrote Färbung an. Der Nachweis gelingt bis zu 0,0144 mg Wasserstoffsuperoxyd.

Der Äther muß vollkommen frei von oxydierenden Verbindungen sein. Zu seiner Reinigung destilliert man ihn über Kaliumbichromatlösung und bewahrt ihn in dunkler Flasche über ziemlich konz. Eisensulfatlösung auf.

<sup>1</sup> N. W. MATTHEWS: Chemist-Analyst 1930, 19, Nr. 4; C. 1930, II, 1885.

<sup>2</sup> A. RICHARDSON: Journ. Chem. Soc. London 63, 1107; Zeitschr. analyt. Chem. 1896, 35, 630.

<sup>3</sup> A. ROGAI: Staz. sperim. agrar. ital. 1914, 47, 569; C. 1915, I, 399.

ζ) Weitere Nachweismethoden mit Vanadin-, Cer-, Kobalt- und Uran-salzen sind vorgeschlagen von J. LUKAS und A. JILEK<sup>1</sup>, K. CHARITSCHKOFF<sup>2</sup> und M. LEUCHTER<sup>3</sup>. N. W. MATTHEWS<sup>4</sup> hat ferner einen Nachweis mit Natriumnitrat (Gelbfärbung) angegeben.

η) Mikrochemischer Nachweis.

αα) Nach C. GRIEBEL<sup>5</sup> versetzt man 1 Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit auf einem mit Hohlsliff versehenen Objektträger mit 1 Tropfen Vanillin-Salzsäurelösung (0,1 g Vanillin in 10 g Salzsäure [25%] unter Erwärmen gelöst). Mit etwas größeren Mengen Wasserstoffsperoxyd tritt nach 5–10 Minuten eine rötlichbräunliche Färbung der Flüssigkeit ein. Bei allmählichem, freiwilligem Verdunsten erfolgt dann Abscheidung von schwarzvioletten bis schwarzblauen, haarfeinen Nadeln, die zu verzweigten Gebilden vereinigt sind.

Besonders schöne Krystalle werden erhalten bei Verwendung einer Alkohol enthaltenden Vanillin-Salzsäure, dargestellt aus 0,1 g Vanillin, 1 ccm Alkohol und 9 ccm Salzsäure (25%). Empfindlichkeitsgrenze 25 γ. Die oben beschriebenen Krystalle lassen sich auch mit Natriumperchlorat und mit Magnesiumsuperoxyd erzielen.

ββ) F. FEIGL und E. FRÄNKEL<sup>6</sup> haben zum mikrochemischen Nachweis eine Reihe von Tüpfelreaktionen vorgeschlagen. Der erste Nachweis beruht auf der Reduktion von Ferrifericyanid zu Berlinerblau. Je 1 Tropfen eines Gemisches gleicher Teile Ferrichloridlösung (0,4%) und Kaliumferricyanidlösung (0,8%) wird in zwei benachbarten Vertiefungen einer Tüpfelplatte mit je 1 Tropfen Wasser bzw. verd. Probelösung versetzt, worauf je nach der Wasserstoffsperoxydmenge eine mehr oder weniger lebhaft Blaufärbung oder ein blauer Niederschlag entsteht. Erfassungsgrenze: 0,08 γ Wasserstoffsperoxyd; Grenzkonzentration: 1 : 600000.

Entfärbung von Nickelioxyd. Zum Nachweis bringt man in zwei benachbarte Vertiefungen einer Tüpfelplatte hirsekorngroße Mengen von Nickelhydroxydpaste und versetzt mit je einem Tropfen der Probelösung bzw. Wasser. Je nach der Menge Wasserstoffsperoxyd tritt Entfärbung oder Aufhellung des Niederschlages ein. Erfassungsgrenze: 0,01 γ Wasserstoffsperoxyd; Grenzkonzentration: 1 : 500000.

Herstellung der Nickelhydroxydpaste. Barytwasser wird mit Bromwasser versetzt und das so gebildete Bariumhypobromit mit Nickelsulfat zusammen erwärmt. Die Mengenverhältnisse von Barium und Nickel sind so zu bemessen, daß ein grauer Niederschlag entsteht, der abfiltriert und gut gewaschen wird. Der nasse Niederschlag von Nickelhydroxyd kann im Wägegöläschen längere Zeit aufbewahrt werden.

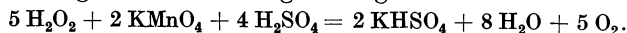
γγ) Nach J. MEYER und A. PAWLETTA<sup>7</sup> bildet sich durch Vereinigung von Vanadat mit Wasserstoffsperoxyd Peroxovanadat, das durch Wasserstoffsperoxyd im Überschuß in gelbe Orthoperoxovanadinsäure  $[\text{VO}_2(\text{OH})_3]$  übergeführt wird. Ausführung: Tüpfelpapier wird mit angesäuertem Alkalivanadat-lösung (1%) getränkt und dann getrocknet. Bei Auftupfen eines Tropfens Probelösung entsteht je nach der Menge des Wasserstoffsperoxyds nach kurzer Zeit ein gelber bis rosenroter Fleck. Erfassungsgrenze: 3 γ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Grenzkonzentration: 1 : 16000.

δδ) Reduktion von Goldsalzen ( $2 \text{AuCl}_3 + 3 \text{H}_2\text{O}_2 = 6 \text{HCl} + 2 \text{Au} + 3 \text{O}_2$ ). Ausführung: 1 Tropfen Probelösung wird mit Goldchlorid kurz erwärmt. Die Lösung wird durch kolloides Gold rötlich oder bläulich umgefärbt. Erfassungsgrenze: 0,07 γ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Grenzkonzentration: 1 : 714000.

εε) Alkalirhodanide reagieren mit Wasserstoffsperoxyd und anderen Oxydationsmitteln unter Bildung einer gelbroten Fällung oder Färbung. Ausführung: 1 ccm mit Schwefelsäure angesäuerte Rhodanidlösung (5%) wird mit 1 Tropfen der Probelösung versetzt und erwärmt. Je nach der Wasserstoffsperoxydmenge bildet sich eine gelbrote Fällung oder Färbung. Erfassungsgrenze: 0,7 γ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Grenzkonzentration: 1 : 71400.

## b) Bestimmung.

α) Maßanalytische Methoden. αα) Kaliumpermanganatmethode. Sie beruht auf folgender Reaktionsgleichung:



<sup>1</sup> J. LUKAS u. A. JILEK: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **76**, 348.

<sup>2</sup> K. CHARITSCHKOFF: Chem.-Ztg. 1910, **34**, 50.

<sup>3</sup> M. LEUCHTER: Chem.-Ztg. 1911, **35**, 1111.

<sup>4</sup> N. W. MATTHEWS: Chemist-Analyst 1930, **19**, Nr 4; C. 1930, II, 1885.

<sup>5</sup> C. GRIEBEL: Mikrochemie 1931, **9**, 313; Zeitschr. analyt. Chem. 1933, **91**, 63.

<sup>6</sup> F. FEIGL: Mikrochemie 1933, **12**, 303; Zeitschr. analyt. Chem. 1934, **96**, 352.

<sup>7</sup> J. MEYER u. A. PAWLETTA: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, **69**, 15.

10 ccm 3%iges oder 1 g 30%iges Wasserstoffsuperoxyd werden in einem Meßkolben auf 100 ccm verdünnt. 20 ccm dieser Lösung werden nach dem Verdünnen auf 100 ccm und nach Zusatz von 25 ccm Schwefelsäure (25%) mit 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung in bekannter Weise titriert. 1 ccm 0,1 N.-Kaliumpermanganatlösung ist gleich 1,701 mg Wasserstoffsuperoxyd.

Für die Bestimmung des Wasserstoffsuperoxydes in der Technik gibt R. FEIBELMANN<sup>1</sup> ein Oxometer an, das gestattet, nach der Titration mit geeigneter Permanganatlösung den Gehalt in Prozenten direkt abzulesen. Das Oxometer ist ein Glaszylinder mit Glasstopfen. Man gibt die zu prüfende Flüssigkeit mit höchstens 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis zu der dafür bestimmten Marke hinein, überschichtet mit 50%iger Schwefelsäure bis zur Marke 0 und gibt die eingestellte Permanganatlösung bis zur Rötung hinzu. Aus der Volumenzunahme der Flüssigkeit wird dann der Gehalt in Prozenten direkt abgelesen. Das Oxometer kann auch zur Bestimmung von festen Superoxyden, von Natriumperborat und von solche enthaltenden Waschmitteln dienen.

ββ) Jodometrische Methoden. Nach dem Deutschen Arzneibuch VI wird der Gehalt an Wasserstoffsuperoxyd in folgender Weise bestimmt: 10 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung (3%) werden in einem Meßkölbchen mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. 10 ccm dieser Lösung werden mit 5 ccm verd. Schwefelsäure und 1 g Kaliumjodid versetzt; die Mischung läßt man in einem verschlossenen Glase 1/2 Stunde lang stehen. Zur Bindung des ausgeschiedenen Jodes dürfen nicht weniger als 17,7 und nicht mehr als 18,9 ccm 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung verbraucht werden, was einem Gehalte von 3 bis 3,2 Gew.-% Wasserstoffsuperoxyd entspricht. 1 ccm 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung = 1,701 mg Wasserstoffsuperoxyd; Stärkelösung als Indicator.

E. RUPP<sup>2</sup> empfiehlt die Bestimmung mittels alkalischer Jodlösung; I. M. KOLTHOFF<sup>3</sup> erhielt jedoch nach dieser Methode etwas zu niedrige Resultate, wenn der Sauerstoff durch Kochen nicht vollends aus der Lösung entfernt wurde.

Bestimmung nach K. W. ROSENMUND<sup>4</sup>. Das Verfahren beruht auf der Übertragung einer von FR. L. HAHN und H. WINDISCH<sup>5</sup> vorgeschlagenen Methode zur jodometrischen Fe<sup>III</sup>-Bestimmung unter Zusatz von Kupferjodür als Katalysator auf Wasserstoffsuperoxyd.

Darstellung des Katalysators. Man löst 4,8 g kryst. Kupfersulfat in 50 ccm Wasser, gießt die Lösung unter Umschütteln zu einer Lösung von 3,5 g Kaliumjodid in 50 ccm Wasser, entfärbt durch Zusatz von Schwefliger Säure oder einer angesäuerten Natriumsulfatlösung. Sobald das ausgefällte Kupferjodür gelblichweiß aussieht, wird es mit Wasser gewaschen, in einen 100 ccm-Kolben gespült und auf 100 ccm aufgefüllt. Für jede Titration werden 0,5–1 ccm der im Dunkeln aufzubewahrenden Aufschwemmung benutzt.

Zu 0,5–1 ccm Katalysator fügt man eine Lösung von 1 g Kaliumjodid in 5 ccm Wasser und 3–5 ccm Salzsäure (25%) hinzu, läßt dann aus einer Pipette 10 ccm der etwa 0,3%igen Wasserstoffsuperoxydlösung unter Umschütteln hinzufließen und titriert mit Thiosulfatlösung und Stärke als Indicator in bekannter Weise.

γγ) Bromometrische Methode nach E. RUPP und G. SIEBLER<sup>6</sup>. Das Verfahren beruht darauf, daß Wasserstoffsuperoxyd in neutraler oder saurer Lösung nur träge mit Arseniger Säure reagiert, daß dagegen in ätzalkalischer Lösung die Oxydation auch bei gewöhnlicher Temperatur fast momentan verläuft. Zur Bestimmung von „Hydrogenium peroxydatum solutum“ werden 10 ccm der Verdünnung von 10 g der Lösung auf 100 ccm im Becherglas von etwa 200 ccm mit 25 ccm 0,1 N.-Arseniger Säurelösung und 3–5 ccm Natronlauge (15%) versetzt. Nach 1 Minute säuert man mit 5–10 ccm Salzsäure (25%) an,

<sup>1</sup> R. FEIBELMANN: Chem.-Ztg. 1931, 55, 540.

<sup>2</sup> E. RUPP: Zeitschr. analyt. Chem. 1921, 60, 401.

<sup>3</sup> I. M. KOLTHOFF: Zeitschr. analyt. Chem. 1921, 60, 401.

<sup>4</sup> K. W. ROSENMUND: Apoth.-Ztg. 1926, 41, 696; C. 1926, II, 1992.

<sup>5</sup> FR. L. HAHN u. H. WINDISCH: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, 68, 370.

<sup>6</sup> E. RUPP u. G. SIEBLER: Pharm. Zentralh. 1925, 66, 193.



erhitzt nach Zugabe von 50 ccm Wasser annähernd zum Sieden und titriert nach Zusatz von einem Tropfen Methylorange mit 0,1 N.-Kaliumbromatlösung auf Entfärbung. 1 ccm 0,1 N.-Arsenige Säurelösung = 1,7 mg Wasserstoffsperoxyd.

In gleicher Weise verfahren auch W. MANCHOT und F. OBERHAUSER<sup>1</sup>. Ein Verfahren zur Bestimmung des Wasserstoffsperoxydes mit Titantrichlorid haben E. KNECHT und E. HIBBERT<sup>2</sup> beschrieben, das sich in der Praxis recht gut bewährt hat. Das Verfahren beruht darauf, daß Wasserstoffsperoxyd bei langsamem Zusatz einer verd. Lösung von Titantrichlorid zuerst tieforangegelb gefärbt wird, und bei weiterem Zusatz die Farbe der Lösung allmählich ganz verschwindet; 1 Mol Wasserstoffsperoxyd entspricht hierbei 2 Mol Titantrichlorid. Zur Bestimmung werden 10 ccm einer Wasserstoffsperoxydlösung (etwa 3%) mit Wasser auf 250 ccm verdünnt. 25 ccm dieser Lösung werden mit eingestellter Titantrichloridlösung bis zum Eintritt der Entfärbung titriert.

Die Titantrichloridlösung muß eisenfrei sein, da ihre Titerstellung gegen eine Eisenoxysalzlösung von bekanntem Gehalt erfolgt. Man läßt die Titantrichloridlösung zur Eisenlösung zufließen, fügt nach fast vollständiger Entfärbung 1 Tropfen Kaliumrhodanidlösung hinzu und titriert bis zum Verschwinden der roten Farbe. Zur Vermeidung von Oxydation durch den Luftsauerstoff wird Kohlendioxyd in den Titrierkolben eingeleitet. Die Titerstellung ist vor jeder Bestimmung erforderlich.

β) Gasvolumetrische Bestimmung. Die Bestimmung beruht auf der Zersetzung des Perhydrols durch Kaliumpermanganatlösung und Messung des dabei frei werdenden Sauerstoffs in einem Gasvolumeter nach LUNGE.

Nach E. MERCK<sup>3</sup> verfährt man, wie folgt: Man bringt in das Innere des Anhängesfläschchens 25 ccm einer wäßrigen Perhydrollösung (10:1000); den äußeren Raum des Zersetzungsgefäßes beschickt man mit 20 ccm einer kaltesättigten wäßrigen Kaliumpermanganatlösung und 15 ccm verd. Schwefelsäure (1,110—1,114). Durch Neigen des Fläschchens läßt man die Perhydrollösung zu der sauren Kaliumpermanganatlösung fließen. Nach der Zersetzung ist noch 3 Minuten lang zu schütteln. 1 ccm Sauerstoff von 0° und 760 mm Druck = 1,52 mg Wasserstoffsperoxyd.

A. FUJITA und T. KODAMA<sup>4</sup> haben ebenfalls eine manometrische Bestimmung des Wasserstoffsperoxydes, die auf seiner Umsetzung mit Kaliumpermanganat beruht, beschrieben.

γ) Colorimetrische Bestimmung nach M. L. ISAACS<sup>5</sup>. 1 ccm einer Wasserstoffsperoxydlösung wird in einem 50 ccm-Meßkolben, der 30 ccm Wasser und 10 ccm Citronensäurelösung (5%) enthält, gegeben, nach Schütteln wird 1 ccm Ammoniummolybdatlösung (10%) hinzugefügt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Als colorimetrische Standardlösung dienen geeignete Lösungen von Kaliumchromat, da eine gleiche Gelbfärbung auftritt.

δ) Thermometrisches Verfahren. C. MAYR und J. FISCH<sup>6</sup> haben ein thermometrisches Verfahren zur Bestimmung des Wasserstoffsperoxydes ausgearbeitet, das auf der Messung der Temperatursteigerung beim Zufügen der Titerlösung mittels BECKMANN-Thermometers beruht. Das Verfahren soll ebenso gute Werte liefern, wie die gewöhnliche Titration mittels Permanganatlösung. Bezüglich der Apparatur und der Ausführungsweise sei auf das Original verwiesen.

<sup>1</sup> W. MANCHOT u. F. OBERHAUSER: Zeitschr. anorg. Chem. 1924, **139**, 40.

<sup>2</sup> E. KNECHT u. E. HIBBERT: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905, **38**, 3318.

<sup>3</sup> E. MERCK: Prüfung der chemischen Reagenzien auf Reinheit 1931, S. 277.

<sup>4</sup> A. FUJITA u. T. KODAMA: Biochem. Zeitschr. 1931, **232**, 15.

<sup>5</sup> M. L. ISAACS: Journ. Amer. Chem. Soc. 1922, **44**, 1662; Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **78**, 304.

<sup>6</sup> C. MAYR u. J. FISCH: Zeitschr. analyt. Chem. 1929, **76**, 418.

# Ausmittelung der Gifte.

Von

Professor **DR. A. GRONOVER**-Karlsruhe.

Mit 22 Abbildungen.

In diesem Abschnitt werden nur die chemischen Methoden, die zur Isolierung und zum Nachweise der Gifte und stark wirkenden Arzneimittel dienen, beschrieben. Die Wirkung der Gifte ist in dem Abschnitt „Gifte“ in Bd. 1, S. 1067 bis 1142, besonders behandelt. Auch die Isolierung der Gifte und stark wirkenden Stoffe, die in Lebensmitteln vorkommen können, wird hier nicht näher erörtert; sie wird bei den einzelnen Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen usw. behandelt. Die Isolierung und der Nachweis dieser Gifte hält sich im übrigen mehr oder weniger auch an die hier beschriebenen Verfahren. Unmöglich ist es, alle stark wirkenden synthetischen Arzneimittel anzuführen. Die Isolierung und Reinigung dieser Stoffe erfolgt jedoch auch nach den angegebenen Methoden.

## Allgemeines.

### 1. Allgemeine, vor der Untersuchung zu beachtende Regeln.

In den meisten Fällen handelt es sich bei dem Nachweis von Giften bzw. starkwirkenden Stoffen um solche Objekte, die von Gerichten, Staatsanwaltschaften oder auch wohl von Privaten eingesandt werden. Es liegen entweder Leichenteile, Speisen oder andere Gegenstände vor, in denen diese Gifte enthalten sein können.

Wenn seitens des Gerichtsarztes bzw. des Gerichtes oder der Staatsanwaltschaft nicht die Prüfung auf ein bestimmtes Gift verlangt wird, so muß bei der Untersuchung allgemein auf alle Gifte Rücksicht genommen werden. In diesem Falle ist es besonders wichtig, sofern der Chemiker zur Leichenöffnung nicht zugezogen wurde, die Akten einer genauen Durchsicht zu unterziehen, da das Sektionsprotokoll und auch etwaige Vernehmungen Fingerzeige geben können, welche Art von Gift vorhanden sein mag; z. B. deutet Starrkrampferscheinung auf Strychnin, Pupillenerweiterung auf Atropin (Tollkirsche) hin. Der mit der Untersuchung betraute Chemiker hat auch das Recht, zur Klärung und Erleichterung der Untersuchung diese oder jene Person zu hören, die auf Grund der Akten unter Umständen Anhaltspunkte bei weiterer Vernehmung geben kann. In solchen Fällen muß der Chemiker einen diesbezüglichen Antrag der betreffenden Behörde übermitteln.

Wenn der chemische Sachverständige zur Sektion nicht zugezogen war, so werden ihm die vom Gerichtsarzt erhobenen Leichenteile und sonstigen Objekte durch die Behörde übersandt. Als Regel sollte gelten, daß die Leichenteile in neuen Glasgefäßen, die vorher gründlich gereinigt sind, untergebracht werden. Die Gefäße mit den Leichenteilen müssen mit dem Amtssiegel verschlossen werden. Auch ist es wichtig, daß die Glasgefäße mit Glasstöpseln versehen sind. Werden dem Sachverständigen (Chemiker) Leichenteile oder sonstige Objekte

von der Behörde eingesandt, so hat er zuerst sein Augenmerk auf die Verpackung zu richten. In dem Protokoll muß der Chemiker angeben, ob die Gefäße versiegelt waren, welche Aufstempelung sie trugen und ob die Siegel unverletzt waren. Falls die Gefäße mit Pergamentpapier verschlossen waren, so ist dieses auch anzugeben. Vielfach werden noch Gefäße mit eingreifenden Glasdeckeln benutzt. Bei diesen besteht die Gefahr, daß Teile von Packmaterial zwischen die Ritzen kommen und bei der Öffnung in den Inhalt fallen. Auch wird bisweilen beobachtet, daß die eingreifenden Deckel ringsum mit Siegellack verschlossen werden. Es ist natürlich unmöglich, den Siegellack so völlig zu entfernen, daß nicht Teilchen in den Inhalt fallen. Da nun Siegellack bisweilen giftige Metalle, wie Blei, Quecksilber oder Zink, enthält, so kann dadurch eine Vergiftung vorgetäuscht werden. Alles dieses muß in einem Protokoll niedergelegt werden, damit es später im Gutachten berücksichtigt werden kann.

## 2. Vorbereitungen zur Durchführung der Untersuchung.

Es ist klar, daß nicht alles Material zur Untersuchung verwendet werden darf. Handelt es sich jedoch nur um sehr geringe Mengen, z. B. um einige Tropfen eines Rückstandes in einer Arzneiflasche, so ist es wohl angebracht, alles Material zu verarbeiten, damit der Erfolg gesichert wird. In solchen Fällen ist die betreffende Behörde vorher zu befragen und nach Möglichkeit ein Teil des isolierten Giftes zu assensieren.

Bei Leichenteilen verfährt man in der Weise, daß man einen Teil des Inhaltes eines jeden Gefäßes für sich verarbeitet. In der Regel entnimmt der Gerichtsarzt folgende Teile der Leiche: Magen und Mageninhalt, Teile vom Darm nebst Darminhalt, Teile der edleren Organe von Milz, Leber, Niere, Herz und Lunge und ferner Teile vom Gehirn, Blut und Urin.

Die Art des Inhaltes der Gefäße, sein Gewicht und die in Arbeit genommene Menge sind zu notieren. Man darf durchschnittlich nicht mehr als den dritten Teil eines jeden Gefäßes zur Untersuchung verarbeiten. Um eine orientierende, schnellere Untersuchung durchführen zu können, kann ein geringer Teil, etwa ein Achtel aus jedem Gefäß, je nach der Menge des Materials, zusammen verarbeitet werden. Wird ein Gift festgestellt, so muß der Inhalt eines jeden Gefäßes alsdann getrennt untersucht werden. Ratsam ist es, stets neue Gefäße zur chemischen Untersuchung der Objekte zu verwenden. Selbstverständlich ist es, daß die Gefäße sehr gut vorher gereinigt werden. Am besten werden sie vorher mit chemisch reiner, warmer Schwefelsäure unter Zusatz von reinem Kaliumdichromat gereinigt, was der Analytiker selbst vornehmen muß.

Die Zerkleinerung der Leichenteile, die in einer Porzellanschale abgewogen werden, geschieht vermittels scharfer Schere, wobei die Leichenteile mit einer Pinzette angefaßt werden.

Vor der Weiterverarbeitung sind die Leichenteile einer Sinnenprüfung zu unterziehen. Auffallender Geruch des Magen- oder Darminhaltes oder des Gehirnes, z. B. nach Blausäure, Phosphor oder flüchtigen Giften, gibt für die spätere Untersuchung wichtige Anhaltspunkte. Bei Verätzungen zeigen die Gewebe oft charakteristische Merkmale, z. B. ist das Gewebe des Magens und der Speiseröhre bei Essigsäurevergiftung dunkelrot und bei Salpetersäurevergiftung gelb (Xanthoprotein) gefärbt. Hellrotes Blut deutet auf Kohlenoxydvergiftung, während braunschwarzes auf Chloratvergiftung hinweist. Ferner ist auch die Reaktion der Leichenteile festzustellen. Falls an den Magenschleimhäuten weiße oder gefärbte Teilchen haften, so sind diese zu isolieren.

Je besser die mechanische Zerkleinerung durchgeführt ist, um so leichter werden den Leichenteilen die Giftstoffe entzogen und die Zerstörung der

organischen Substanz gefördert. Handelt es sich nicht um den Nachweis von Metallen und von Arsen, so kann man sich sehr vorteilhaft einer Fleischhackmaschine bedienen.

Nach Entnahme der Leichenteilproben sind die Gefäße zu schließen und mit dem Amtssiegel zu versiegeln. Am besten bewahrt man sie im Eisschrank auf. Keinesfalls darf den Leichenteilen ein Konservierungsmittel zugesetzt werden. Es ist verschiedentlich ein Alkoholzusatz zur Konservierung vorgeschlagen worden, was jedoch nur unter gewissen Umständen ratsam erscheint.

### **3. Beschaffenheit der zur Verwendung gelangenden Chemikalien.**

Die sog. chemisch reinen Reagenzien genügen ohne weiteres keinesfalls für forense Untersuchungen; sie sind einer vorhergehenden Prüfung und nötigenfalls einer Reinigung zu unterziehen. Arsen z. B. findet sich in Spuren fast in allen Reagenzien. Sind diese nicht arsenfrei, so kann unter Umständen ein positiver Arsenbefund vorgetäuscht werden.

Über die Reinigung der Chemikalien und ihre Prüfung s. den Anhang S. 1434.

### **4. Isolierung der Gifte, Feststellung ihrer Verbindungsform und ihre Konservierung.**

Die Isolierung der Gifte wird in den folgenden Abschnitten eingehend erörtert. Es genügt nicht, wenn man ein Gift, z. B. Barium, in dem Magen- und Darminhalt feststellt, vielmehr muß seine Verbindungsform nachzuweisen versucht werden. So ist z. B. Bariumsulfat wegen seiner fast absoluten Unlöslichkeit, auch in verdünnten Säuren, ungiftig. Giftig ist dagegen Bariumcarbonat, da dieses in verdünnten Säuren, also in der Säure des Magens, löslich ist. Ähnlich verhält es sich mit Quecksilbersulfid und -chlorür gegenüber Quecksilberchlorid. Wenn die Verbindungsform als solche sich nicht isolieren läßt, so ist, wenigstens bei Metallvergiftungen, das Metall als solches (Quecksilber, Arsen usw.) zu asservieren. Z. B. kann man Blei in Bleichromat überführen, Blausäure in Silbercyanid, Phosphor in seine Molybdändoppelverbindung. Alkaloide und giftig wirkende Arzneimittel sind als solche oder in Gestalt ihrer Salze als Rückstände auf Uhrgläsern oder in Präparatengläschen aufzuheben. Flüchtige Gifte, z. B. Anilin, Chloroform, bewahrt man in zugeschmolzenen Glasröhrchen auf.

### **5. Abfassung des Gutachtens.**

Bei der Abfassung des Gutachtens schildert man zuerst, wie die Verpackung der einzelnen Objekte war, ob Glasgefäße mit Glasstopfenverschluß oder sonstige Packungen verwendet wurden, ob unverletzte Siegel und mit welcher Aufstempelung vorhanden waren. Alsdann ist der Inhalt der Gefäße und die Menge, die zur Untersuchung entnommen wurde, anzugeben. Weiterhin folgen die bei der Sinnenprüfung gemachten Wahrnehmungen. Ferner ist die Reaktion der Inhalte der einzelnen Gefäße zu vermerken, was deshalb wichtig ist, weil daran zu erkennen ist, ob z. B. die Leichenteile schon eine wesentliche Zersetzung erlitten haben.

Nun beginnt die Beschreibung des analytischen Ganges, der zum Nachweis des Giftes eingeschlagen wurde. Diese Beschreibung darf nicht weit-schweifig sein, sondern muß kurz und bündig niedergelegt werden; die wesentlichsten Feststellungen sind besonders hervorzuheben. Sofern eine quantitative Bestimmung durchführbar war, muß die Menge des isolierten Giftes auf 100 g Substanz und auch auf die ganze Menge des übersandten Materials für jedes Gefäß besonders berechnet werden.

Ferner ist kurz zu erwähnen, daß die angewandten Chemikalien die nötige Reinheit besaßen.

Zum Schluß ist auch anzugeben, wenn solches überhaupt möglich war, in welcher Verbindungsform das Gift vorhanden und ob es in Wasser oder ganz verdünnter Salzsäure, dieses bei Giften, die sich noch im Magen- oder Darminhalt befanden, löslich war.

Das isolierte Gift ist als Beweismittel, *Corpus delicti*, sofern solches erübrigt werden konnte, dem Gutachten beizufügen.

Zu beachten ist noch, daß der Chemiker sich streng an die an ihn gestellte Frage hält. Zu beurteilen, ob die von ihm gefundene Menge Gift und die Verbindungsform giftig wirken konnten, ist lediglich Sache des medizinischen Sachverständigen.

## 6. Giftarten.

Die Gifte können mannigfachster Natur sein. Obleich aber die Zahl der Gifte und namentlich die der neueren, stark wirkenden und mithin giftigen Arzneimittel außerordentlich groß ist, handelt es sich im allgemeinen doch meist nur um relativ wenige Gifte, die zu Vergiftungszwecken immer wieder benutzt werden, was wohl zum Teil an der Unkenntnis der meisten Menschen auf diesem Gebiete liegt. Natürlich können auch Gifte vorkommen, die man sehr selten antrifft, z. B. Selenige Säure oder Strophantin. Vielfach hat man in solchen Fällen Anhaltspunkte, namentlich dann, wenn es sich um Selbstmord handelt und sich nahezu geleerte Medizinflaschen oder Reste von Tabletten usw. am Tatort noch vorfinden.

Nicht berücksichtigt sind in den nachfolgenden Ausführungen die Gifte, die durch Bakterien erzeugt werden und infolge ihrer den Eiweißstoffen nahestehenden Zusammensetzung meist auf chemischem Wege nicht faßbar sind.

## Prüfung auf Gifte durch Vorproben.

Wie schon oben bei der Abfassung des Gutachtens erwähnt wurde, ist vor allem die Reaktion des zu untersuchenden Materials zu prüfen. Stark alkalische Reaktion ohne Anzeichen einer Verwesung der Leichenteile lassen eine Vergiftung durch Laugen oder in Wasser lösliche alkalisch reagierende Salze schließen. Stark saure Reaktion des Magens bzw. Mageninhaltes weist auf eine Vergiftung durch Säuren hin, namentlich dann, wenn Verätzungen der Speiseröhre und der Magenschleimhaut festgestellt wurden. Ähnliche Verätzungen treten auch bei Einwirkung von ätzenden Alkalien auf. Eine Gelbfärbung der Schleimhäute kann von Salpetersäure herrühren, schwarzrote Färbung wird durch Essigsäure hervorgerufen. Grüne Verfärbung des Magen- oder Darminhaltes oder grüne Schleimfäden an den Schleimhäuten kann von Schweinfurtergrün, einer Arsen-Kupferverbindung, oder von Kupfer- oder Chromsalzen herrühren. Rotfärbung kann auf die Anwesenheit von Quecksilberoxyd, Quecksilberjodid, Mennige oder gefällttem Antimonsulfid hindeuten. Schwarzfärbung kann von schwärzlich gefärbtem Blut bei Chloratvergiftung oder von Metalloxyden oder Metallsulfiden herrühren. Gelbfärbung läßt auf die Anwesenheit von Arsensulfid, Cadmiumsulfid oder Gummigutt schließen.

Handelt es sich um gefärbte, schwer lösliche Verbindungen obiger Art, so wird man meist noch in den Falten der Schleimhäute Material sammeln und isolieren können. Bemerkt sei noch, daß Anilinfarben alle möglichen Färbungen hervorrufen können, obwohl derartige Farbstoffe sich wohl nur selten im Magen- bzw. Darminhalt bei Vergiftungen vorfinden, da sie selbst meist ungiftig sind.

Auch die geruchliche Sinnenprüfung kann Anhaltspunkte geben, nach welcher Richtung hin man auf Gifte weiter fahnden muß. So läßt sich bei einer

Vergiftung durch Blausäure im Mageninhalt und auch im Gehirn bisweilen ein an bittere Mandeln erinnernder Geruch feststellen. Die chemische Untersuchung zeigt alsdann, ob es sich um Nitrobenzol (Mirbanöl), ungiftigen Benzaldehyd oder um Blausäure handelt. Auch viele andere flüchtige Gifte, wie Schwefelkohlenstoff, organische flüchtige Halogenverbindungen, Chloroform usw., können ihre Anwesenheit durch charakteristische Gerüche zu erkennen geben. Weißer Phosphor ist an dem eigentümlichen Phosphorgeruch bei nicht in Verwesung befindlichen Leichenteilen feststellbar. Breitet man den Mageninhalt in einer Schale aus und erwärmt vorsichtig auf etwa 50°, so kann man im Dunkeln häufig noch das Aufleuchten von Phosphorteilchen beobachten.

Der Mageninhalt (Speisebrei) oder auch Erbrochenes ist ebenfalls einer genauen Durchsicht zu unterziehen. Fragmente von Samen oder Blättern können die Art der Vergiftung kennzeichnen, z. B. lassen die morphologisch typischen Blätter des Schierlings, des Fingerhutes, der Tollkirsche, die Samen des Stechapfels, des Bilsenkrautes, der Brechnuß diese Feststellung zu. Grünlich schillernde Teilchen lassen auf Anwesenheit von spanischen Fliegen schließen.

Vermittels einer Pinzette versucht man, die fraglichen pflanzlichen oder mineralischen Stoffe zu isolieren. Gelingt dieses nicht, so muß man das Ausschüttelungsverfahren anwenden. Durch Sedimentation oder durch Aufsteigen von Teilchen an die Oberfläche nach dem Schütteln mit Wasser und Stehenlassen in einem Glaszylinder oder Spitzglas kann man unter Umständen zum Ziele kommen. Auch kann man bei nicht wasserhaltigen Objekten diese mit Chloroform anschütteln.

Durch Dialyse in saurer oder alkalischer Lösung können Giftstoffe in das Dialysat übergehen und nach dem Eindampfen der Dialysierflüssigkeit nachgewiesen werden. Obgleich die Eiweißstoffe mit Metallsalzen unlösliche Verbindungen bilden, so können unter Umständen in saurer Lösung doch Metalle in Lösung übergeführt und durch Dialyse gewonnen werden. Bariumsalze, Chlorate usw. lassen sich durch das Dialysierverfahren ziemlich frei von organischen Substanzen im Dialysat anreichern. Als Dialysiermembran ist gereinigte Schweinsblase oder bleifreies Pergamentpapier anzuwenden. Auch sind im Handel Dialysierhülsen erhältlich. Über die Methode der Dialyse s. S. 1422.

Aus dem Magen- und Darminhalt bzw. Erbrochenen lassen sich durch Elektrolyse, wenn auch nicht quantitativ, die Metalle rein gewinnen, die alsdann leicht näher identifiziert werden können.

### Erster Teil.

## Mit Wasserdämpfen flüchtige Gifte

und einzelne nicht flüchtige, giftige Verbindungen, die chemische Verwandtschaft mit den flüchtigen Giften besitzen.

Der Nachweis der mit Wasserdämpfen flüchtigen Gifte erfolgt eigentlich erst nach der Prüfung auf Phosphor. Wenn auch beim Phosphornachweis nach MITSCHERLICH außer Phosphor ein Teil der flüchtigen Gifte in das Destillat mit übergegangen ist, so bleiben doch schwerer flüchtige Gifte noch in dem Destillationsrückstand zurück. Deshalb verfährt man nun im allgemeinen, wenn keine anderen Verfahren angezeigt sind, in der Weise, daß die gut zerkleinerten Teile, seien es Leichenteile, Mageninhalt, Erbrochenes usw., die man am besten durch eine Fleischhackmaschine treibt, in einen geräumigen Kolben gebracht werden, der des Schäumens wegen nur zu etwa  $\frac{1}{3}$  angefüllt sein darf. Der Inhalt des Kolbens wird mit Weinsäure oder verd. Schwefelsäure schwach angesäuert und der Destillation unterworfen. Vielfach ist es auch ratsam, vorher den Inhalt

des Kolbens mit Natriumcarbonat schwach alkalisch zu machen und dann erst anzusäuern.

Die Anordnung des Destillationsapparates ist aus Abb. 1 ersichtlich.

Der Kolben wird schräg in ein Wasserbad oder bei schwerer flüchtigen Körpern in ein Paraffinbad gestellt, und durch das bis fast auf den Boden des Kolbens ragende Rohr Wasserdampf eingeleitet. Die Destillation ist so zu führen, daß Tropfen für Tropfen aus dem gut wirkenden, mit einem Vorstoß versehenen Kühler in die Vorlage gelangt, die etwas Wasser enthält, in welches das Rohr des Vorstoßes eintaucht. Die Vorlage stellt man am besten in Eiswasser.

Bei sehr leicht flüchtigen Stoffen ist es empfehlenswert, sie bei gelinder Wärme im Kohlensäurestrom überzutreiben. Destillieren keine flüchtigen Stoffe

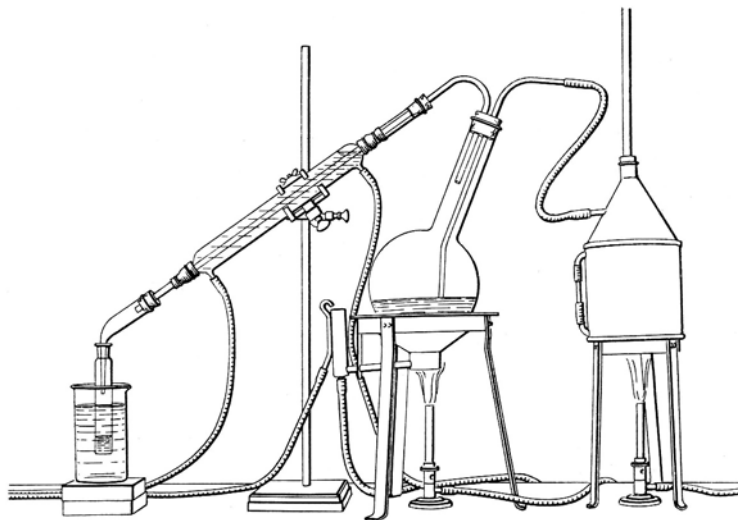


Abb. 1. Wasserdampfdestillationsapparat.

mehr über, so kann man die Destillation im Wasserdampfstrom weiter führen. Die ersten übergelenden Anteile, wenige Kubikzentimeter, werden gesondert aufgefangen, und dieses fraktionierte Auffangen mehrmals wiederholt. Alsdann wird die Destillation solange fortgesetzt, bis man sicher ist, daß nichts mehr an flüchtigen Stoffen im Kolben vorhanden ist.

Die Destillate sind einer Sinnenprüfung zu unterziehen. Geruch und Geschmack können wesentliche Anhaltspunkte geben. Auch ist festzustellen, ob sich etwa Öltröpfchen auf der Oberfläche des Destillates abgeschieden, oder ob sich solche auf den Boden gesenkt haben, oder ob Krystalle in dem Destillat schwammen.

Auch die Reaktion des Destillates ist festzustellen und auf sein Verhalten gegen NESSLERs Reagens und Eisenchloridlösung zu prüfen, und ferner ist die Azofarbstoffreaktion auszuführen. Siehe Phenole, S. 1312.

Weitere Vorprüfungen s. S. 1292.

Unter Umständen ist es angezeigt und notwendig, die Destillation aus alkalischer Lösung vorzunehmen, da auf diese Weise organische Basen und Körper neutralen oder nur schwach sauren Charakters mit Wasserdampf übergehen.

Mit Hilfe der Wasserdampfdestillation können außer Phosphor aus den Untersuchungsobjekten isoliert werden: Blausäure, Alkohol, Aldehyde,

Ketone, Äther, Phenole, Säuren, Ester, organische Basen, Nitro-  
körper, ätherische Öle und Kohlenwasserstoffe u. a. m.

## I. Phosphor und Phosphorverbindungen.

### 1. Phosphor.

Es kommt als Gift nur der weiße, auch wohl gelber Phosphor genannt, in Betracht, während der rote Phosphor, sofern er frei von weißem Phosphor ist, keine giftigen Eigenschaften besitzt. Weißer Phosphor wurde früher zur Herstellung von Zündhölzern benutzt, jetzt findet er nur noch Verwendung als Phosphorbrei zur Vertilgung von Nagern. Als Medikament kommt Phosphoröl in geringer Menge in den Verkehr. Giftige Verbindungen des Phosphors werden weiter unten erörtert.

#### a) Vorproben auf Phosphor.

Der Mageninhalt, Erbrochenes und Phosphor enthaltende Mischungen leuchten, in einer Schale ausgebreitet und auf 50° erwärmt, vielfach auf, was am besten im Dunkeln beobachtet werden kann; auch bilden sich bei größeren Mengen weißliche Dämpfe. Der Geruch ist ein typischer, den man als Phosphorgeruch bezeichnet.

**Vorprobe nach SCHERER**<sup>1</sup>. Ein kleiner Teil des Objektes wird nach vorheriger guter Durchmischung mit etwa 20 ccm Wasser und mit verd. Schwefelsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und in einen ausreichend großen Kolben gegossen. In den Kolben hängt man einen Fließpapierstreifen, der mit verd. Silbernitratlösung und einen zweiten, der mit Bleiessiglösung befeuchtet ist, ein. Die Papierstreifen werden in einem Schnitt, den man in einen Korken macht, befestigt. Den Kolben setzt man alsdann auf ein etwa 50° erwärmtes Wasserbad und läßt ihn längere Zeit darauf stehen. Tritt Schwärzung des Silberpapierstreifens ein, so kann Phosphor vorliegen, dieses um so mehr, wenn der mit Bleiessiglösung befeuchtete Papierstreifen nicht geschwärzt wird. Werden beide Papierstreifen geschwärzt, so kann neben Schwefelwasserstoff dennoch Phosphor vorhanden sein. Man kann auch den Kolben 24 Stunden lang im Dunkeln stehen lassen und dann die Veränderung der Papierstreifen beobachten. Vorhandenen Schwefelwasserstoff bindet man dadurch, daß man dem Gemisch etwas Cadmiumsulfat zusetzt. Wird alsdann der Silberpapierstreifen noch geschwärzt, so kann es sich nicht um Schwefelwasserstoff handeln. Allerdings rufen z. B. Formaldehyd und Ameisensäure auch eine Schwärzung des Silberpapiers hervor.

Zur weiteren Vorprüfung behandelt man den geschwärzten Silberpapierstreifen mit etwas Königswasser und dampft die nach dem Verdünnen mit Wasser erzielte Lösung nach der Filtration ein. Der mit Salpetersäure aufgenommene Rückstand wird auf etwa 80° erwärmt und erwärmte Ammoniummolybdatlösung zugefügt. Entsteht eine gelbe Färbung oder ein gelber Niederschlag, so ist die Anwesenheit von gelbem Phosphor sehr wahrscheinlich.

#### b) Nachweis des Phosphors.

**α) Nachweis nach MITSCHERLICH**<sup>2</sup>. Der Nachweis des weißen Phosphors nach MITSCHERLICH beruht auf seiner Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen, die sich durch Aufleuchten bemerkbar macht. Das Aufleuchten ist ein Oxydationsvorgang, der durch die im Glasrohr befindliche Luft bewirkt wird. Die Methode

<sup>1</sup> SCHERER: Liebigs Ann. 1859, 112, 224.

<sup>2</sup> E. MITSCHERLICH: Methode zur Entdeckung des Phosphors bei Vergiftungen. Journ. prakt. Chem. 1855, 66, 238.



ist namentlich dann anwendbar, wenn man eine stärkere positive Reaktion nach der SCHERERSchen Vorprobe erhalten hat.

Die Ausführung der Reaktion ist folgende (Abb. 2): Das zerkleinerte Untersuchungsmaterial wird in einen geräumigen, etwa zu ein Drittel gefüllten Destillationskolben mit langem Hals gebracht, mit Wasser solange versetzt, bis ein weicher Brei entsteht und mit Weinsäure oder verd. Schwefelsäure angesäuert.

Der Hals des Destillationskolbens ist mit einem Gummistopfen verschlossen, durch den ein ziemlich weites, zweimal rechtwinkelig gebogenes Glasrohr führt. Die Länge des aufsteigenden Schenkels beträgt etwa 50 cm, die des horizontalen etwa 50—60 cm und die des absteigenden Schenkels etwa 60—75 cm. Über den letzteren ist ein Kühlmantel gezogen, durch den Wasser zirkulieren kann, um die übergehenden Wasserdämpfe zu kondensieren. Die ganze Apparatur ist im Dunkelmzimmer aufzustellen. Zweckmäßig setzt man den Destillationskolben in ein BABOSches Luftbad, um ein Anbrennen zu vermeiden, was beim Erhitzen auf einem Drahtnetz leicht der Fall sein kann. Als Vorlage dient ein Kölbchen, in dem sich etwas Wasser befindet, in welches das absteigende Rohr hineinragt.

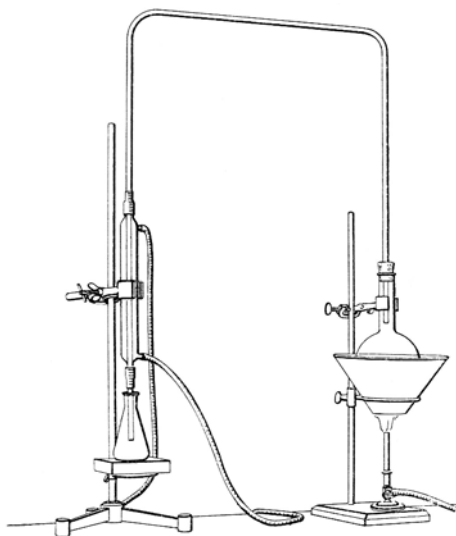


Abb. 2. Phosphornachweis nach MITSCHERLICH.

Bei Anwesenheit von Phosphor macht sich ein typischer Geruch bemerkbar. Riecht das Destillat mercaptanähnlich, so liegt wahrscheinlich Phosphoresquisulfid vor. Im Destillat schwimmen alsdann meist kristalline, gelbe Flocken herum.

Mit der Destillation beginnt man langsam und schwenkt den Kolben zuweilen um. Wenn weißer Phosphor zugegen ist, so tritt meist schon ein Aufleuchten im Kolben, namentlich beim Umschütteln, ein. Um durch den Schein des Brenners nicht getäuscht zu werden, umgibt man diesen mit einem Pappkarton. Während des weiteren Erwärmens vermehrt sich das Aufleuchten im Kolben und schließlich tritt bei genügender Steigerung der Wärme ein leuchtendes Flämmchen in

dem Halse des Kolbens auf, das dann in dem aufgesetzten Glasrohr langsam weiter gleitet. An der Stelle, wo der Kühlmantel anliegt, verweilt das Flämmchen kurze Zeit und geht schließlich in die Vorlage und verlischt. Ist dieses eingetreten, so ist der Nachweis des weißen Phosphors erbracht. Während der Destillation macht sich, wenn mehr Phosphor vorliegt, ein knoblauchartiger Geruch bemerkbar, und finden sich in der Vorlage kleine Phosphorkügelchen.

Zur weiteren Identifizierung des Phosphors oxydiert man einen Teil des vorher geschüttelten Destillates mit Chlor- oder Bromwasser oder auch mit Königswasser, löst den Abdampfrückstand in verd. Salpetersäure auf und gibt der erwärmten Lösung Ammoniummolybdatlösung zu. Liegt mehr Phosphor vor, so kann man auch den oxydierten Trockenrückstand mit Wasser aufnehmen und Magnesiamixtur zusetzen. Bildet sich im ersteren Falle eine Gelbfärbung oder tritt ein gelber Niederschlag von Ammoniumphosphat und Molybdänsäureanhydrid,  $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_3 + 12\text{MoO}_3$ , auf, oder entsteht ein weißer kristalliner Niederschlag von Ammonium-Magnesiumphosphat, so ist auch hierdurch die Anwesenheit von weißem Phosphor erwiesen.

Ein Nichtleuchten im MITSCHERLICHschen Apparat beweist das Fernsein von weißem Phosphor nicht durchaus, da viele organische Stoffe, wie Äther, Alkohol, Essigäther, Benzin, Terpentinöl u. a. und ferner Metallsalze, z. B. die des Quecksilbers, Kupfers und Silbers, das Leuchten verhindern. Im Falle der Anwesenheit flüchtiger, störender Stoffe kann bei weiterer Destillation, wenn diese Stoffe überdestilliert sind, ein Leuchten später noch eintreten. Es ist deshalb erforderlich, nicht zu früh die Destillation zu unterbrechen.

Sind störende Substanzen nicht vorhanden, so können nach MITSCHERLICH 0,06—0,3 mg Phosphor in 200 ccm Wasser nachgewiesen werden.

Das Leuchten wird jedoch nicht allein von weißem Phosphor hervorgerufen, sondern auch von solchen Phosphorverbindungen, die weißen Phosphor abspalten. Zu diesen Verbindungen zählt das Phosphoresquisulfid (Tetraphosphortrisulfid)  $P_4S_3$ , das jetzt in der Zündholzindustrie Anwendung findet und ungiftig ist. Dieser gelbe, krystalline Körper spaltet bei Temperaturen über  $75^{\circ}$  weißen Phosphor ab, während er bei Temperaturen bis zu  $50^{\circ}$  unverändert bleibt.

Auf jeden Fall muß bei einem positiven Befunde, d. h. wenn Leuchten eintritt, noch weiter auf die Anwesenheit von weißem Phosphor geprüft werden. Hierzu dient die Methode von SCHENCK und SCHARFF, die S. 1282 beschrieben wird.

Tritt ein Leuchten nach MITSCHERLICH nicht ein, und kann in der Vorlage Phosphor durch die Molybdänreaktion nachgewiesen werden, so wurde das Leuchten durch andere Stoffe, wie schon besprochen, verhindert. Man kann alsdann die Methode von H. NATTERMANN und A. HILGER, oder auch die Methode von FRESSENIUS und BABO, bzw. SCHERER (S. 1279) anwenden.

Der weiße Phosphor kann sich aber auch bereits oxydiert haben, trotzdem man festgestellt hat, daß er nach einem Monat noch in Leichen als solcher nachweisbar war. In solchen Fällen müßten alsdann noch seine ersten Oxydationsprodukte, die Unterphosphorige und Phosphorige Säure, vorhanden sein. Um diesen Nachweis anzutreten, bedient man sich des Verfahrens nach DUSART und BLONDLOT (S. 1283).

3) **Nachweis nach H. NATTERMANN und A. HILGER<sup>1</sup>.** Die Methode ist der MITSCHERLICHschen ähnlich. Auch hier wird der Phosphor mit Wasserdämpfen übergetrieben, die Destillation wird im Kohlensäurestrom vorgenommen.

Der Kolben (Abb. 3), der die Objekte enthält, wird mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen, durch dessen eine Bohrung ein Rohr bis fast zum Boden des Kolbens reicht. Durch dieses Rohr wird mit Wasser gewaschene Kohlensäure geleitet. Durch die andere Bohrung führt ein doppelt gebogenes Steigrohr, genau wie beim MITSCHERLICHschen Apparat, nur ist in der Mitte des horizontal verlaufenden Rohres ein Glasröhrchen angeblasen, über das ein kurzer Gummischlauch mit einem zu einer Spitze ausgezogenen Glasröhrchen gezogen ist, der mittels eines Quetschhahnes verschlossen werden kann. Der absteigende Teil des Glasrohres ist luftdicht mit einer Saugflasche verbunden die ihrerseits mit einem Peligotrohr verbunden ist, welches mit einer Saugpumpe in Verbindung steht. In der Saugflasche und dem Peligotrohr befindet sich eine 3%ige Silbernitratlösung.

Nachdem nun alle Luft durch Kohlensäure verdrängt ist, was längere Zeit erfordert, wird der Kolben mit den Leichenteilen erwärmt. Am besten stellt man ihn wie beim MITSCHERLICHschen Apparat in ein BABOSches Luftbad. Wenn das Steigrohr heiß geworden ist, öffnet man von Zeit zu Zeit den Quetschhahn an dem kleinen Röhrchen. Tritt eine leuchtende Flamme auf, so ist die Anwesenheit von weißem Phosphor erwiesen. Man kann auch so verfahren, daß man die Kohlensäurezuleitung abstellt, vermittels der Saugpumpe schwach evakuiert und den Quetschhahn am Ansatzröhrchen öffnet. Es wird hierdurch

<sup>1</sup> H. NATTERMANN u. A. HILGER: Über den Nachweis des Phosphors bei forensisch-chemischen Arbeiten. Forschungsberichte über Lebensmittel 1897, 4, 241.

Luft eingesogen. Wenn Phosphor vorhanden ist, so tritt im ganzen Rohr ein Leuchten auf.

Wenn man länger im Kohlensäurestrom destilliert, so kann man den Phosphor mit den Wasserdämpfen quantitativ übertreiben, soweit das überhaupt möglich ist, da ein geringer Teil des Phosphors sich oxydiert hat. Durch die Silbernitratlösung in den Vorlagen wird der Phosphor in Phosphorsilber ( $\text{PAg}_3$ ) umgewandelt, der sich als schwarzer Niederschlag ausscheidet (s. S. 1284).

Bemerkt sei noch, daß diesem Verfahren auch die Mängel anhaften, die schon beim MITSCHERLICH'Schen Verfahren besprochen wurden. Allerdings kann bei diesem Versuch noch Leuchten eintreten, wo der MITSCHERLICH'Sche Versuch versagt hat.

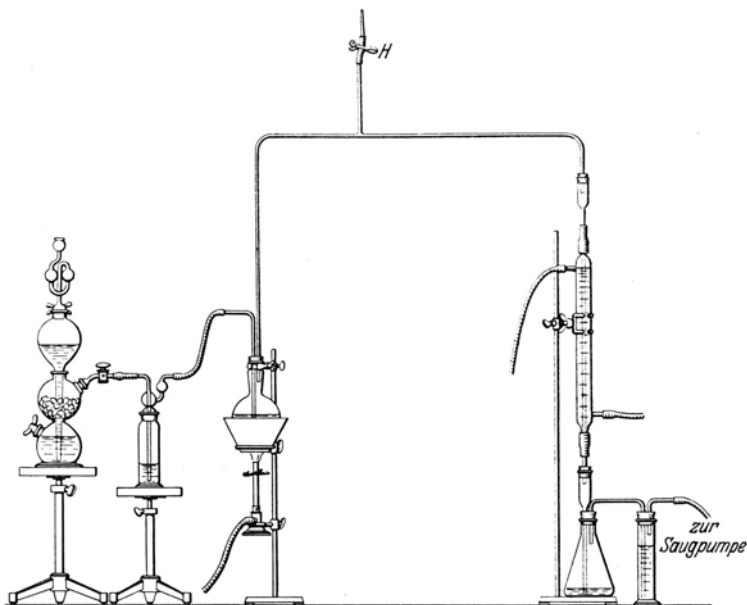


Abb. 3. Apparat zum Phosphornachweis. (Nach NATTERMANN und HILGER.)

γ) **Nachweis nach FRESENIUS und NEUBAUER**<sup>1</sup>. Diese Methode beruht darauf, daß mit einer einfachen Destillationsapparatur der Phosphor im Kohlensäurestrom abdestilliert und in einer Silbernitratlösung aufgefangen wird. Der Kolben, der das Untersuchungsmaterial enthält, wird auf 60–70° erwärmt und, damit nicht zuviel Wasser überdestilliert, eine geeignete Rückflußkühlung angebracht. Das ausgeschiedene Phosphorsilber wird auf einem Asbestfilterchen gesammelt und wie bei der Methode von DUSART und BLONDLOT (S. 1283) weiter untersucht.

δ) **Nachweis von R. SCHENCK und E. SCHARFF**<sup>2</sup>. Diese Methode ist eigentlich für den Nachweis von weißem Phosphor in Zündhölzern ausgearbeitet und beruht auf der Fähigkeit des weißen Phosphors, die Luft zu ionisieren. Es werden also die Blättchen eines geladenen Elektroskops bei Anwesenheit von weißem Phosphor bzw. seinen Dämpfen zusammenfallen, sich entladen.

Wie schon beim Phosphornachweis nach MITSCHERLICH erwähnt wurde, spaltet das ungiftige Phosphorsesquisulfid, das an Stelle des giftigen weißen Phosphors jetzt in der Zündholzindustrie benützt werden muß, bei 100° geringe

<sup>1</sup> FRESENIUS u. NEUBAUER: Zeitschr. analyt. Chem. 1862, 1, 351.

<sup>2</sup> R. SCHENCK u. E. SCHARFF: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1906, 39, 152.

Mengen Phosphor ab, die ein Leuchten bewirken und mithin weißen Phosphor vortäuschen können.

Bei 50° zersetzt sich Phosphoresquisulfid nicht und gibt an der Luft keine Dämpfe weißen Phosphors ab.

Es ist also, wenn nach MITSCHERLICH oder NATTERMANN und HILGER ein positiver Befund auf weißen Phosphor erhalten wurde, notwendig, den Beweis noch anzutreten, daß das Leuchten nicht von zersetztem Phosphoresquisulfid herrührt. Tritt jedoch nach R. SCHENCK und E. SCHARFF ein positiver Befund ein, so stammt das nach MITSCHERLICH oder NATTERMANN und HILGER beobachtete Leuchten von weißem Phosphor selbst her. Wie aus der Abb. 4 zu ersehen ist, befindet sich eine größere Waschflasche in einem Becherglas, das auf einer Asbestplatte steht und zu etwa  $\frac{2}{3}$  mit Wasser gefüllt ist. Die Waschflasche selbst ist mit dem bis zu einem dünnen Brei mit Wasser versetzten

Untersuchungsmaterial zu etwa  $\frac{1}{3}$  beschickt; ihr seitlicher Ansatz ist durch ein Glasrohr mit einem Blechgefäß, der Ionisationskammer, verbunden, auf welcher ein Elektroskop, dessen Zerstreuungskörper in die Blechkanne hineinragt, aufgesetzt ist. Vor dem eigentlichen Versuch ist der Abfall des geladenen Elektroskops zu prüfen. Wenn es gut trocken ist — man kann

zwecks Austrocknung durch einen seitlichen Stutzen etwas Natriummetall, auf eine Nadel gesteckt, in das Elektroskop bringen —, so ist innerhalb  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{2}$  Stunde kein wesentlicher Abfall der Spannung zu beobachten. Das bis auf den Boden der Waschflasche tauchende Rohr ist mit einem Handgebläse versehen. Man wärmt nun langsam das Becherglas mit Wasser an, die Temperatur darf aber nicht über 50° steigen, was man an einem in das Becherglas gesenkten Thermometer beobachten kann. Wenn man annehmen kann, daß die Substanz in der Waschflasche 50° erreicht hat, bläst man langsam Luft durch die Flüssigkeit. Ist weißer Phosphor zugegen, so tritt Phosphordampf mit der feuchten Luft in die Ionisationskammer und bewirkt einen Abfall der Spannung, ein Zusammenfallen der Blättchen. Man kann nach vorherigem Aufladen des Elektroskops den Versuch mehrmals wiederholen. Es lassen sich so noch 0,04 mg weißer Phosphor nachweisen.

ε) Nachweis nach DUSART und BLONDLOT<sup>1</sup>. Dieser Nachweis muß dann angetreten werden, wenn die vorher beschriebenen Methoden versagt haben und die Annahme besteht, daß schon eine Oxydation des weißen Phosphors eingesetzt hat. Es handelt sich also in solchen Fällen um Leichenuntersuchungen, bei denen zwischen Tod und Vornahme der Untersuchung einige Zeit

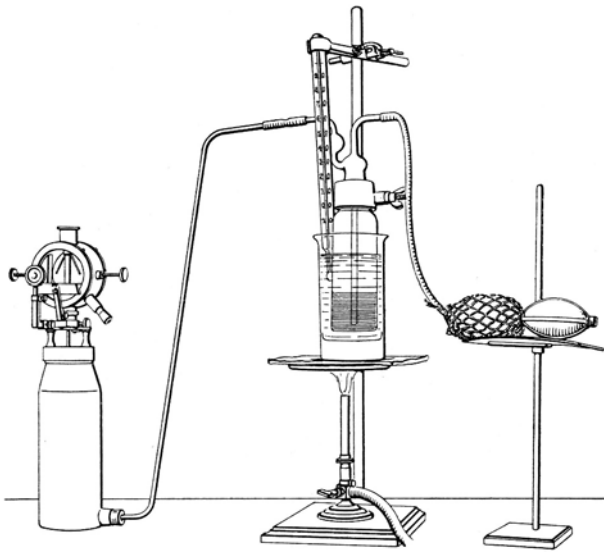


Abb. 4. Phosphornachweis. (Nach SCHENCK und SCHARFF.)

<sup>1</sup> DUSART u. BLONDLOT: Compt. rend. Paris 1856, 43, 1126 u. 1861, 52, 1197.

verstrichen ist. Die ersten Oxydationsstufen des Phosphors sind die Unterphosphorige und die Phosphorige Säure. Diese beiden Säuren werden durch naszierenden Wasserstoff zu Phosphorwasserstoff ( $\text{PH}_3$ ) reduziert, während die höchste Oxydationsstufe, die Phosphorsäure, durch Wasserstoff nicht mehr reduziert wird. Für die Beurteilung ist dieses deshalb wichtig, da phosphorsaure Salze durch die Nahrung dem Organismus zugeführt werden.

Die Objekte (Leichenteile, Mageninhalt usw.) werden gründlich zerkleinert, mit etwas Wasser zu einem dünnen Brei angerührt und in einen Kolben (Abb. 5) von etwa 150 ccm Inhalt gebracht. Zu diesem Inhalt fügt man verd. reine Schwefelsäure (1:5) und reines phosphorfrees Zink. Der Kolben ist mit einem doppelt durchbohrten Stopfen versehen. Durch die eine Bohrung führt ein Trichterrohr bis auf den Boden des Kolbens, während durch die andere Bohrung ein Glasrohr führt, durch das die Gase entweichen können. Das entweichende Gas Wasserstoff, unter Umständen auch Phosphorwasserstoff und Schwefelwasserstoff, leitet man durch ein U-Rohr mit Bimssteinstückchen, die mit Kalilauge befeuchtet sind, um den Schwefelwasserstoff zurückzuhalten. Alsdann tritt das

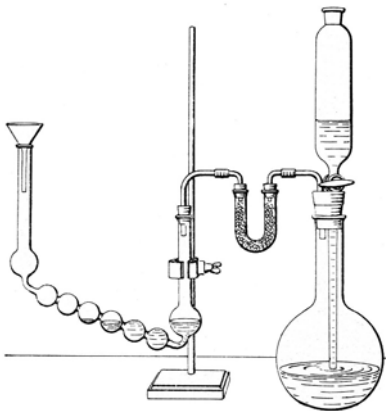


Abb. 5. Phosphornachweis nach DUSART und BLONDLOT.

Gas in ein mit Kugeln versehenes Rohr, in dem sich eine 3%ige neutrale Silbernitratlösung befindet. Hier wird der Phosphorwasserstoff in Phosphorsilber ( $\text{PAg}_3$ ) übergeführt, welches in schwarzen Flitterchen in der Silbernitratlösung herum schwimmt. Die Reduktion ist eine sehr unvollkommene, man findet nur etwa  $\frac{1}{5}$  der vorhandenen Phosphormenge wieder. Auch braucht man den Versuch nicht zu lange ausdehnen, etwa zwei Tage genügen, bis man ihn unterbricht. Jedoch muß von Zeit zu Zeit Säure zugefügt werden, damit die Wasserstoffentwicklung regelmäßig anhält.

Das ausgeschiedene Phosphorsilber wird auf einem Filterchen gesammelt, mit sehr wenig Wasser ausgewaschen und

in dem von NATTERMANN und HILGER angegebenen Apparat auf Phosphor in folgender Weise geprüft:

In einem kleinen KIPPSchen Apparat wird aus phosphorfrees Zink und verd. Schwefelsäure Wasserstoff entwickelt, der durch zwei Waschflaschen, von denen die erstere mit Silbernitrat, die zweite mit konz. Schwefelsäure zu etwa  $\frac{1}{4}$  angefüllt ist, in ein Kölbchen von etwa 100 ccm Inhalt, das mit dreifach durchbohrtem Gummistopfen verschlossen ist, geleitet wird. In dieses Kölbchen bringt man den auf dem Filterchen gesammelten Niederschlag nebst Filter, welches zerschnitten ist, und einige Stückchen reinen Zinks. Durch die eine Öffnung des Stopfens führt ein Trichterrohr bis auf den Boden des Kölbchens, aus der anderen Öffnung wird das Gas durch ein U-Rohr geleitet, das mit Bimssteinstückchen angefüllt ist, die mit Kalilauge getränkt sind. An dieses Rohr schließt sich ein rechtwinklig gebogenes Glasrohr an, dessen Ende eine Platinspitze trägt. Zündet man, nachdem alle Luft entwichen ist, den Wasserstoff an, so darf er nur mit bläulicher Flamme verbrennen. Ist dieses der Fall, so ist das im KIPPSchen Apparat entwickelte Wasserstoffgas frei von Phosphorwasserstoff. Nun preßt man durch das Trichterrohr verd. Schwefelsäure (1:5). Ist Phosphor zugegen, so wird die Flamme durch den im Kölbchen sich entwickelnden Phosphorwasserstoff intensiv grün gefärbt.

Einfacher verfährt man nach C. STICH<sup>1</sup> (Abb. 6); man sammelt das ausgeschiedene Phosphorsilber auf einem ALLIHNSchen Röhren, in dem sich unten eine etwa 1½ cm hohe Asbestschicht befindet, wäscht schnell mit wenig Wasser aus und trocknet es. Der in einem KIPPSchen Apparat aus reinem Zink entwickelte Wasserstoff wird in zwei zwischengeschalteten Waschflaschen, von denen die eine Silbernitratlösung, die andere konz. Schwefelsäure enthält, gewaschen. Das Wasserstoffgas tritt alsdann in das eingeschaltete ALLIHNSche Rohr, das den Phosphorsilberniederschlag enthält, und von dort in ein U-Rohr, das mit Bimssteinstückchen beschickt ist, die mit Kalilauge getränkt sind, um alsdann durch ein Glasrohr, das eine Platinspitze trägt, zu entweichen. Nachdem durch den Wasserstoff die Luft aus dem Apparat gedrängt ist, wird das entweichende Wasserstoffgas an der Platinspitze angezündet. Brennt die Flamme nur bläulich, so ist der im KIPPSchen Apparat entwickelte Wasserstoff phosphorfrei. Als dann setzt man unter das ALLIHNSche Röhren eine kleine Bunsenflamme; es bildet sich aus dem Phosphorsilber Phosphorwasserstoff, der nun die Wasserstoffflamme grün färbt.

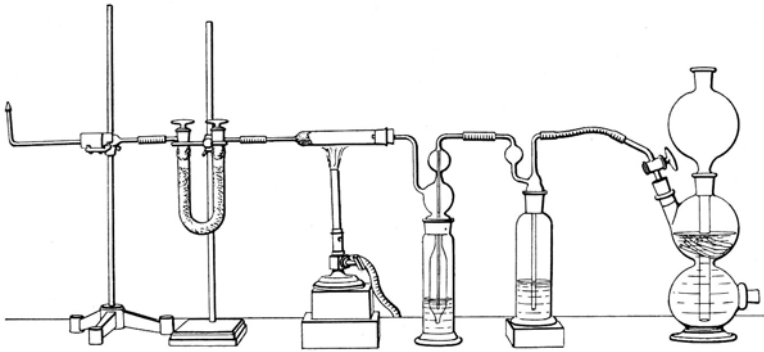


Abb. 6. Apparat zur Erhitzung des Phosphorsilberniederschlags. (Nach STICH.)

Man kann auch den Phosphorwasserstoff nach NATTERMANN und HILGER statt in Silbernitratlösung in eine Kupferchlorürlösung leiten. Die Lösung wird in folgender Weise bereitet: 4 g reines Kupferchlorür werden in 20 ccm reiner Salzsäure vom Spez. Gew. 1,19 gelöst und mit 30 ccm einer 12%igen Kalilauge versetzt. Nach etwa 3 Stunden wird die Lösung von den ausgeschiedenen Krystallen abgossen und 20 ccm davon benutzt. Man läßt die Entwicklung zur Reduktion der Säuren etwa 14 Tage lang gehen. An Stelle des ALLIHNSchen Rohres nach STICH (s. oben) wird eine Kugelröhre, in der sich die Kupferchlorürlösung befindet, eingeschaltet. Als dann folgt noch ein Chlorcalciumrohr, dann das U-Rohr mit Bimssteinstückchen und Kalilauge und schließlich das Rohr mit Platinspitze. Das Kugelrohr stellt man in ein Gefäß mit Wasser und erwärmt auf etwa 70°. Es muß bei Gegenwart von Phosphor bzw. Phosphorwasserstoff die gleiche Grünfärbung eintreten.

Ferner kann man auch die grüne Phosphorflamme im Spektralapparat beobachten. Die geringsten Spuren von Phosphor geben drei grüne Linien, von denen zwei stärker gefärbt sind als die dritte. Auf diese Weise kann man sich auch vorher durch Leerversuche von der Reinheit des Zinks überzeugen.

Es sollen noch 0,00006 mg Phosphor angezeigt werden.

Zu der Methode der Reduktion ist noch zu bemerken, daß aus phosphorreichen Organen, z. B. dem Gehirn, sich flüchtige Phosphorverbindungen

<sup>1</sup> C. STICH: Über die Bildung gasförmiger Phosphorverbindungen bei der Fäulnis. Mitt. a. d. analyt. Laboratorium d. Krankenhaus-Apotheke zu Leipzig.

abspalten können, namentlich wenn die Organe in Fäulnis übergegangen sind, die die Anwesenheit von weißem Phosphor bzw. seinen Oxydationsprodukten vortäuschen. SELMI will solche nachgewiesen haben, was jedoch von Z. HALÁSZ<sup>1</sup> bestritten wurde. Auch MARPMANN und STICH wollen flüchtige Phosphorverbindungen gefunden haben. Aus alledem geht hervor, daß man mit der Deutung eines positiven Befundes nach DUSART und BLONDLOT sehr vorsichtig sein muß.

Phosphoresquisulfid, amorpher Phosphor und Hypophosphite, welch letzteres wohl als Arzneimittel Anwendung findet, können Oxydationsprodukte des weißen Phosphors vortäuschen. Bei Einnahme von Hypophosphiten sind diese schon nach 24 Stunden wieder aus dem Organismus ausgeschieden.

Der Nachweis von weißem Phosphor mißlingt auch, wenn Quecksilbersalze zugegen sind.

### c) Bestimmung des Phosphors.

Die Bestimmung des Phosphors in Leichenteilen, Mageninhalt usw. kann durch Übertreiben im Kohlensäurestrom nach FRESSENTUS und NEUBAUER oder NATTERMANN und HILGER erfolgen. Der entweichende Phosphor wird in 3%iger Silbernitratlösung aufgefangen, das ausgeschiedene Phosphorsilber abfiltriert und oxydiert (S. 1279). Das Filtrat enthält nun den Phosphor als Phosphorsäure, die mit Magnesiamixtur gefällt und als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung gebracht wird.

In Phosphorlatwergen kann nach F. MACH und LEDERLE die Bestimmung des Phosphorgehaltes in der Weise vorgenommen werden, daß man die Masse mit Gips verreibt und im Schüttelzylinder mit einer gemessenen Menge Schwefelkohlenstoff ausschüttelt. Ein aliquoter Teil wird durch Ausschüttelung mit Bromwasser oxydiert und die gebildete Phosphorsäure nach Verjagung des Schwefelkohlenstoffes mit Magnesiamixtur gefällt und nach dem Glühen als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung gebracht.

In Phosphorölen wird der Phosphor nach KATZ<sup>2</sup> in der Weise bestimmt, daß man 10 ccm Öl mit etwa 20 ccm 5%iger Kupfernitratlösung solange stark schüttelt, bis sich eine beständige schwarze Emulsion gebildet hat. Alsdann fügt man 10 ccm Äther und in kleinen Mengen 10 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung hinzu. Wenn nach starkem Schütteln die Schwarzfärbung nicht völlig verschwinden sollte, so gibt man noch mehr Wasserstoffsuperoxyd hinzu. Dann wird die wäßrige Lösung vom Äther getrennt und der Äther dreimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die wäßrigen Ausschüttelungen werden zur Entfernung von geringen Ölsuren durch ein angefeuchtetes Filter filtriert. Dem Filtrat setzt man Ammoniak hinzu, fällt die gebildete Phosphorsäure mit Magnesiamixtur und bringt sie als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung.

Nach STICH<sup>3</sup> kann man Phosphoröl in einem Gemisch von Alkohol, Äther und Aceton lösen und mit gesättigter konz. acetonischer Silbernitratlösung versetzen. Die auftretende Trübung in der Mischung wird im Colorimeter oder Stufenphotometer, nach KÖSZEGI<sup>4</sup>, mittels einer Vergleichslösung verglichen, und so der Gehalt an Phosphor ermittelt.

## 2. Phosphorwasserstoff (PH<sub>3</sub>) und Phosphine.

Durch Einatmung von Phosphorwasserstoff sind schon wiederholt Vergiftungen vorgekommen. Der Phosphorwasserstoff setzt sich im Organismus schnell unter Bildung von Phosphoriger Säure und Phosphorsäure um.

<sup>1</sup> Z. HALÁSZ: Zeitschr. anorgan. allg. Chem. 1900, 26, 438.

<sup>2</sup> KATZ: Arch. Pharm. 1904, 121.

<sup>3</sup> STICH: Zeitschr. anorg. Chem. 1927, 40, 1014.

<sup>4</sup> KÖSZEGI: Pharm. Zentralh. 1934, 75, 34.

Vergiftungen bei Zersetzung von Ferrosilicium<sup>1</sup>, welches Phosphor, als Phosphorcalcium, enthält und durch Feuchtigkeit Phosphorwasserstoff abspaltet, sind häufiger beobachtet worden.

Aus der Luft läßt sich der Phosphorwasserstoff durch Durchleiten der Luft durch Silbernitratlösung oder Kupferchlorürlösung auffangen, nachweisen und auch bestimmen; s. S. 1284.

In Leichenteilen kann der Nachweis nach DUSART-BLONDLOT versucht werden.

Im Phosphorwasserstoff kann der Wasserstoff durch 1—3 Alkylreste ersetzt werden. Es entstehen die primären, sekundären und tertiären Phosphine, die einen furchtbaren Geruch aufweisen. Bisher wurden Vergiftungen durch diese Art von Phosphorverbindungen nicht beobachtet. Auch die quaternären Verbindungen dürften bedeutungslos sein.

### 3. Phosphorhalogene.

Von den Halogenverbindungen des Phosphors sind die des Chlors die bekanntesten und zwar Phosphortrichlorid,  $\text{PCl}_3$ , Phosphorpentachlorid,  $\text{PCl}_5$  und Phosphoroxychlorid,  $\text{POCl}_3$ . Alle drei Verbindungen werden durch Wasser zersetzt und bilden neben freier Salzsäure Phosphorige Säure bzw. Phosphorsäure. Auch ihr Nachweis ist bei Vergiftungen erschwert, da Salzsäure und Phosphorsäure bzw. ihre Salze Bestandteile des normalen Gewebes sind. Vor allem wirken diese Gifte ätzend. Nachweis s. unter Halogene, S. 1425.

## II. Blausäure, Cyanide, komplexe Cyanide und Rhodanide.

### 1. Blausäure.

Von den Salzen der Blausäure, Cyanwasserstoffsäure,  $\text{HCN}$ , sind die komplexen Cyanide wenig giftig oder ungiftig. Da sie aber in der Hitze Blausäure abspalten können, so müssen die zu untersuchenden Objekte vorher auf diese Verbindungen geprüft werden, um eine Vortäuschung giftiger Blausäure zu vermeiden. Wichtig ist es, festzustellen zu versuchen, an welches Metall die Blausäure, sofern keine Komplexverbindungen vorliegen, gebunden ist. Z. B. kann Quecksilbercyanid oder Kaliumcyanid vorliegen. Eine alkalische Reaktion bei Anwesenheit von Blausäure würde im Mageninhalt anzeigen, daß die Blausäure an ein Leichtmetall, Kalium oder Natrium, gebunden ist. Zu erwähnen ist noch, daß das Blut bei Blausäurevergiftungen hell kirschrot ist und die Leibeshöhlen, Bauchhöhle, Schädelhöhle, nach Blausäure riechen. Spektralanalytisch läßt sich die Blausäure im Blut nicht direkt nachweisen. Die Blausäure ist ein Enzymgift. Trotz genügenden Sauerstoffgehaltes des Blutes tritt Erstickung ein.

#### a) Vorprobe nach SCHÖNBEIN.

Die gut zerkleinerten Objekte (Leichenteile, Mageninhalt, Erbrochenes usw.) werden mit Weinsäure schwach angesäuert und mit Wasser hinreichend verdünnt.

Oft macht sich schon beim Öffnen der Gefäße, in denen die Objekte eingeschickt wurden, oder auch wenn man die zerkleinerten Objekte einige Zeit im verschlossenen Kolben stehen läßt, ein typischer Geruch nach Blausäure bemerkbar.

Die SCHÖNBEINSche Probe wird in der Weise ausgeführt, daß man einen Filtrierpapierstreifen, der mit einer schwach alkoholischen Lösung von Guajaccharz getränkt und nach dem Verdunsten des Alkohols mit ganz verdünnter Kupfersulfatlösung (1 : 1000) übergossen wurde, in einen Einschnitt eines

<sup>1</sup> P. LEHNERING: Z. 1906, 12, 132.



Korkes einklemmt und in den Kolben hängt, der einen geringen Teil des angesäuerten und zerkleinerten Objektes enthält. Ist Blausäure vorhanden, so tritt schon nach kurzer Zeit eine starke Blaufärbung ein. Zu lange darf man nicht warten, da schon die Einwirkung der Luft eine schwache Blaufärbung bewirkt.

Die Reaktion ist eine Oxydationsreaktion, indem die Blausäure bei Gegenwart von Kupfersulfat atomaren Sauerstoff bildet, der die Guajaconsäure des Harzes blau färbt.

Tritt die Reaktion nicht ein, so sind Blausäure oder deren giftige Salze mit Ausnahme von Schwermetallsalzen nicht vorhanden.

### b) Nachweis der Blausäure.

Nachweis bei Anwesenheit von Ferro- und Ferricyaniden und Rhodaniden: Man stellt einen wäßrigen Auszug aus dem Objekte her und setzt zu einem Teil, der schwach mit Salzsäure angesäuert ist, verd. Eisenchloridlösung. Eine Rotfärbung deutet auf die Anwesenheit von Rhodaniden, tritt dagegen eine Blaufärbung ein, so sind Ferrocyanide, gelbes Blutlaugensalz, die ferner mit Kupfersulfat eine Rotfärbung geben, vorhanden. Zu einem anderen Teil des Auszuges setzt man verd. Salzsäure und verd. Ferrosulfatlösung. Eine Blaufärbung würde Ferricyanide, rotes Blutlaugensalz, anzeigen. Berlinerblau, das in Wasser unlöslich ist und sich, falls mehr vorhanden ist, durch die Farbe zu erkennen gibt, bringt man entweder durch Oxalsäurelösung oder Ammoniumtartrat in Lösung, aus welcher es auf Zusatz von Salzsäure wieder abgeschieden wird.

Nitroprussidverbindungen lassen sich ebenfalls mit Wasser ausziehen. Die Lösung gibt auf Zusatz von Natriumsulfidlösung eine Blaufärbung.

Sind diese Cyanide nicht vorhanden, so kann man die Blausäure, wie folgt, nachweisen: Man destilliert, wie schon bei der allgemeinen Methode der Wasserdampfdestillation angegeben wurde, einige Kubikzentimeter ab und fängt noch einige weitere Kubikzentimeter getrennt auf. Mit den ersten und eventuell auch nachfolgenden Destillaten können folgende Reaktionen auf Blausäure ausgeführt werden:

α) Prüfung nach SCHÖNBEIN, wie schon oben (S. 1287) beschrieben.

β) Prüfung mit schwach alkalischer Phenolphthalinlösung, der Leukobase des Phenolphthaleins. Fügt man zu einigen Tropfen dieser Lösung eine kleine Menge des Destillates und einige Tropfen einer Kupfersulfatlösung (1:2000), so wird infolge der Bildung von atomarem Sauerstoff, wie beim SCHÖNBEINschen Versuch, die Leukobase des Phenolphthaleins unter Bildung von Phenolphthalein oxydiert, das in alkalischer Lösung eine Rotfärbung hervorruft. Auch diese Reaktion ist eine Oxydationsreaktion.

γ) Berlinerblau-Reaktion: Schüttelt man wenige Tropfen des Destillates einige Minuten unter vorheriger Zugabe von etwas Ferro- und Ferrisalzlösung und etwas Natronlauge und erwärmt gelinde, so bildet sich Berlinerblau. Wenn man die Anschüttlung mit verd. Schwefelsäure ansäuert, so tritt entweder eine starke Blaufärbung oder, wenn wenig Blausäure vorhanden ist, eine Grünfärbung auf. Läßt man die Lösung längere Zeit stehen, so setzen sich auch in der grün gefärbten Lösung blaue Flöckchen von Berlinerblau,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3\text{Fe}_4$ , ab.

2 mg Blausäure in 1 Liter Wasser können so noch nachgewiesen werden.

δ) Rhodanprobe nach LIEBIG. Ein Teil des Destillates wird mit wenigen Tropfen frischen gelben Schwefelammoniums und einigen Tropfen Kalilauge versetzt und in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand, der nun Rhodankalium enthält, wird in wenig

Wasser unter Zusatz von etwa Salzsäure gelöst und die Lösung durch ein gehärtetes Filter, um den fein verteilten Schwefel zurückzuhalten, filtriert. Auf Zusatz von einigen Tropfen Eisenchloridlösung tritt bei Gegenwart von Blausäure eine blutrote Färbung von Ferrirhodanid,  $(\text{CNS})_3\text{Fe}$ , ein.

Es kann 0,1 mg Blausäure in 1 Liter Wasser noch nachgewiesen werden.

e) Nitroprussid-Reaktion. Zu einem Teil des Destillates setzt man einige Tropfen Kaliumnitritlösung, 2—4 Tropfen Eisenchloridlösung und vorsichtig so viel verd. Schwefelsäure, daß die Färbung eben in Hellgelb umschlägt. Die Lösung wird zum Sieden erhitzt, Ammoniak in geringem Überschuß zugegeben und dem Filtrat stark verdünnte Schwefelammoniumlösung zugesetzt. Eine Violettfärbung, die bald in Blau, Grün und Gelb übergeht, zeigt Blausäure an. 0,3 mg Blausäure können noch in 1 Liter Wasser nachgewiesen werden.

ζ) Pikrinsäure-Reaktion. Erwärmt man einige Tropfen des Destillates mit einigen Tropfen Kalilauge und einigen Tropfen Pikrinsäurelösung, so geht bei Gegenwart von Blausäure die Gelbfärbung in eine Rotfärbung über.

η) Silbernitrat-Reaktion. Einige Tropfen des Destillates, mit wenig Wasser verdünnt, geben auf Zusatz von Silbernitratlösung einen weißen Niederschlag von Silbercyanid,  $\text{CNAg}$ . Um eine Täuschung mit Chlorsilber zu vermeiden, was eigentlich schon ausgeschlossen ist, da Salzsäure aus verdünnten wäßrigen Lösungen nicht überdestilliert, kann man das Destillat nochmals über Borax destillieren, der die Salzsäure zurückhält.

Wird das gesammelte Cyansilber länger erhitzt, so spaltet es sich in Silber und Dicyan,  $\text{NC—CN}$ , das an seinem charakteristischen stechenden Geruch erkennbar ist.

### c) Nachweis der Blausäure bei Gegenwart von komplexen Cyaniden und Rhodaniden.

Da die komplexen Cyanide und Rhodanide beim Erhitzen unter Einwirkung von Säuren Spuren Blausäure abspalten, so verfährt man am besten nach der Methode von JACQUEMIN<sup>1</sup>, indem man die zu untersuchenden Objekte mit Natriumbicarbonat im Überschuß versetzt, den Kolbeninhalt auf 60° erwärmt und Kohlensäure in langsamem Strome durchleitet. Am besten stellt man den Kolben in ein Wasserbad von 60°. Man leitet das Übergehende in eine Vorlage, die etwas Wasser enthält, in die der Stutzen des Vorstoßes hineinragt. Die Vorlage selbst stellt man in Eiswasser. Quecksilbercyanid spaltet hierbei keine Blausäure ab, setzt man aber einige Kubikzentimeter Schwefelwasserstoff zu, das die komplexen Cyanide nicht zersetzt, so kann man auch aus dem Quecksilbercyanid die Blausäure übertreiben.

Das aufgefangene Destillat wird alsdann auf Blausäure wie oben geprüft.

Man kann auch an Stelle der Methode von JACQUEMIN sich der Ausschüttlung der Cyanide nach der Methode von BARFOED<sup>2</sup>, die von BEKURTS modifiziert worden ist, bedienen. Komplexe Cyanide sind in Äther nicht löslich, während Blausäure und Quecksilbercyanid aus der wäßrigen, weinsauer gemachten Lösung der Objekte mit Äther ausgeschüttelt werden können. Um keinen Verlust zu erleiden, ist der Äther nach jeder Ausschüttlung, die mehrmals zu wiederholen ist, mit alkoholischer Kalilauge bis zur schwach alkalischen Reaktion zu versetzen, wodurch die Blausäure in das beständigere Salz übergeführt wird. Der nach dem Austreiben des Äthers verbleibende Rückstand wird mit Weinsäurelösung versetzt und die Blausäure überdestilliert und wie oben nachgewiesen.

<sup>1</sup> JACQUEMIN: Ann. Chim. Phys. 4, 135; Arch. Pharm. 1876, 208, 170.

<sup>2</sup> BARFOED: Lehrbuch der organisch qualitativen Analyse. Kopenhagen: Hort u. Sohn.

Ist Quecksilbercyanid, das auch in Äther löslich ist, vorhanden, so setzt man zum Rückstand Schwefelammoniumlösung hinzu. Tritt eine Schwarzfärbung ein, so kann Quecksilber zugegen sein, das noch als solches (s. S. 1409 unter Quecksilber) nachgewiesen werden muß.

Den Rückstand der Ätherausschüttlung kann man mit gelbem Schwefelammonium versetzen und abdampfen, dann mit verdünnter Säure schwach ansäuern, vom ausgeschiedenen Schwefel und Quecksilbersulfid durch Filtration trennen und einige Tropfen verd. Eisenchloridlösung zugeben. Wird die Lösung blutrot, so ist Blausäure, die in Rhodan übergeführt wurde (s. Rhodanreaktion S. 1288) nachgewiesen. Gibt der Rückstand der ätherischen Ausschüttlung, in Wasser aufgenommen und schwach mit Salzsäure angesäuert, auf Zusatz von einigen Tropfen Eisenchloridlösung eine blutrote Färbung, so ist ein Rhodanid zugegen, das ebenfalls in Äther löslich ist. Bei Anwesenheit von Rhodan verfährt man in der Weise, daß man die Blausäure nach vorherigem Zusatz von Natriumbicarbonat bei 60° im Kohlensäurestrom übertreibt (s. Methode von JACQUEMIN, S. 1289). Rhodanwasserstoffsäure geht nach dieser Methode, wie von uns festgestellt wurde, nicht mit über.

#### d) Nachweis von Blausäure in Samen und Blättern.

In den Kirschlorbeerblättern, den bitteren Mandeln und Kernen von Prunaceen, sowie in Bohnensorten befindet sich ein Glykosid, das in Gegenwart eines Fermentes durch Wasser zerlegt wird und Blausäure teils frei, teils in gebundener Form abspaltet; so ist z. B. im Bittermandelwasser die Blausäure an Benzaldehyd, als Cyanhydrin,  $C_6H_5CH(OH)CN$ , gebunden, während in Mondbohnen die Blausäure an Aceton als Acetoncyanhydrin gebunden ist (s. unter Glykoside, S. 1333).

Die Blausäure kann auch in solchen Fällen nach der Destillationsmethode isoliert und nachgewiesen werden. Bei dieser Destillation geht auch Benzaldehyd mit über, der jedoch nicht so leicht flüchtig ist wie die Blausäure. Ist im Destillat Blausäure nicht nachweisbar und riecht es trotzdem nach Blausäure bzw. Benzaldehyd, so ist nur ungiftiges Benzaldehyd vorhanden. Auch der Destillationsrückstand riecht in solchen Fällen meist nach Benzaldehyd, falls solcher vorhanden ist, da er schwer flüchtig ist.

Eine vollständige Spaltung des Benzaldehydcyanhydrins erreicht man im Destillat dadurch, daß man Ammoniak zusetzt und dann mit Mineralsäure ansäuert. Dieses ist für die quantitative Bestimmung der Gesamtblausäure wichtig.

In einigen Lebensmitteln, z. B. den Mond-, Rangoon- oder Lima-Bohnen (*Phaseolus lunatus*) befindet sich ebenfalls Blausäure (s. oben) in glykosidartiger Bindung<sup>1</sup>. Der Nachweis kann durch Ausziehen der fein zermahlenden Bohnen mit Wasser in einem geschlossenen Kolben und nachfolgende Destillation, wie oben beschrieben, erbracht werden. Die Spaltung des Glykosides verläuft am besten bei einer  $p_H$ -Stufe von  $p_H$  6<sup>1</sup>, also bei sehr schwach saurer Reaktion.

#### e) Nachweis von Blausäure in der Luft und im Blut.

Nach SIEVERTS und HEMSDORF kann man in der Luft qualitativ mittels Benzidin-Kupferacetatpapier Blausäure nachweisen. Selbst bei einem Gehalt von nur 0,015 g in 1 cbm tritt nach einigen Sekunden Grünfärbung des Papiers ein. Reagens: 150 ccm  $H_2O$  + 10 ccm 3% Kupferacetatlösung und 50 ccm kaltes gesättigte essigsäure Benzidinlösung. Oder man leitet die Luft durch verd. Kalilauge; vorhandene Blausäure wird in Cyankalium übergeführt. Die Lösung

<sup>1</sup> S. K. HAGEN: Z. 1928, 55, 284.

wird mit Weinsäurelösung angesäuert und die in Freiheit gesetzte Blausäure abdestilliert. Der Nachweis im Destillat geschieht, wie oben (S. 1288) angegeben.

Im Blut läßt sich die Blausäure auf spektralanalytischem Wege nachweisen. Das meist auffallend rote bzw. kirschrote Blut wird 1 : 100 mit Wasser verdünnt und in eine Küvette gefüllt. Zugleich richtet man eine reine Blutlösung, Menschen- oder Tierblut, 1 : 100 her und füllt dieselbe ebenfalls in eine Küvette. Nun stellt man bei beiden Lösungen im Spektralapparat fest, daß sie die typischen Absorptionstreifen des Oxyhämoglobins zeigen. Die beiden luftdicht verstöpselten Küvetten läßt man 12 Stunden und noch länger unter Umständen bei etwa 25—30° stehen. War die Küvette mit dem reinen Blut dunkler gefärbt und zeigte nicht mehr das Spektrum des Oxyhämoglobins, zeigte dagegen das fragliche Blut eine noch hellrote Färbung und das Spektrum des Oxyhämoglobins, so enthielt das Blut dieser Küvette Blausäure. Hier ist durch die Blausäure die Selbstreduktion des Blutes verhindert worden.

#### f) Bestimmung der Blausäure.

Die Bestimmung der Blausäure erfolgt in der Weise, daß man sie durch Destillation entweder in weinsaurer Lösung oder, wenn auch komplexe Cyanverbindungen vorhanden sind, in natriumbicarbonat-alkalischer Lösung bei 50° im Kohlensäurestrom übertreibt und in gemessener 0,05 oder 0,01 N.-Silbernitratlösung auffängt. Hierzu bedient man sich am besten eines PELIGOT-Rohres oder eines Kugelhöhrenapparates.

Das ausgeschiedene Cyansilber kann nach Filtration und Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther und Trocknen bei 105° zur Wägung gebracht werden.

Wenn das Cyansilber nicht rein weiß ist, so kann das davon herrühren, daß Spuren Schwefelsilber sich mit ausgeschieden haben. Man löst den Niederschlag alsdann in überschüssigem Ammoniak und filtriert vom ungelösten Schwefelsilber ab. Das Filtrat wird mit verd. Salpetersäure angesäuert, und das so gereinigte Cyansilber, wie oben, zur Wägung gebracht.

0,1 g Cyansilber = 0,0201 g Blausäure, CNH.

Man kann auch die überschüssig vorgelegte, gemessene Silberlösung mit 0,05 oder 0,01 N.-Rhodanlösung zurückmessen. Die Lösung ist alsdann mit Salpetersäure anzusäuern und nach Zusatz von Ferriammoniumsulfat als Indicator mit Rhodanlösung nach der Methode von VOLHARD zurückzumessen.

Zu bemerken ist noch, daß, wenn mit sehr verdünnten Lösungen gearbeitet wird, z. B. 0,01 N.-Lösung, leicht übertitriert werden kann, da der Farbumschlag durch die geringe, sich nicht zusammenballende Menge Rhodansilber unscharf wird. Man nimmt die Titration alsdann in einem Stöpselglase vor und überschichtet die wäßrige Lösung mit einer etwa 1/2 cm hohen Schicht Äther. Nach jedem Zutropfen der Rhodanlösung schüttelt man kräftig um. Das Rhodansilber schwimmt alsdann oben und läßt den Umschlag des Ferrirhodanids scharf erkennen. Es ist zweckmäßig, zum Vergleich eine Stöpselflasche mit der gleichen, nahezu austitrierten Menge Silbernitratlösung, Salpetersäure und Ferriammoniumsulfatlösung neben die zu bestimmende Flüssigkeit zu stellen, um den Farbumschlag besser beobachten zu können.

1 ccm 0,05 N.-Silbernitratlösung = 1,35 mg Blausäure.

1 ccm 0,01 N.-Silbernitratlösung = 0,27 mg Blausäure.

Enthalten die Objekte freie Salzsäure, so kann etwas Salzsäure unter Umständen mit übergehen. Man fängt alsdann das Destillat in Natronlauge auf, säuert schwach mit Weinsäure an und destilliert die Lösung über etwas Borax. Alsdann kann man das Destillat in Silbernitratlösung auffangen.

#### g) Bestimmung des Benzaldehydecyanhydrins.

Benzaldehydecyanhydrin, Mandelsäurenitril und die abgespaltene Blausäure in Destillaten der Mandeln und Prunaceenkerne (s. oben) können durch Titration nach VOLHARD bestimmt werden. Um die quantitative Spaltung des Cyanhydrins

zu bewirken, wird die vorgelegte und gemessene Silbernitratlösung mit Ammoniak versetzt, nach beendeter Destillation mit Salpetersäure angesäuert und nach VOLHARD zurücktitriert.

Setzt man kein Ammoniak zu, so wird das Benzaldehydcyanhydrin nicht zerlegt, und nur die freie Blausäure als Cyansilber ausgefällt. Sammelt man den Niederschlag, trocknet und wägt ihn (s. oben), so kann man daraus den Gehalt an freier Blausäure berechnen. Die Silbernitratlösung enthält nun noch das unveränderte Benzaldehydcyanhydrin in Lösung. Fügt man Ammoniak hinzu, so spaltet sich das Benzaldehydcyanhydrin. Säuert man nun mit Salpetersäure an, so scheidet sich die Blausäure als Cyansilber ab. Man kann das ausgeschiedene Cyansilber zur Wägung bringen oder auch die unzersetzte Silbernitratlösung nach VOLHARD zurückmessen und aus dem Gesamtverbrauch so die freie und gebundene Blausäure berechnen, von der man den Wert an freier Blausäure abzuziehen hat, um die gebundene Blausäure zu erhalten.



Dieses auch als Zyklon bezeichnete Schädlingsbekämpfungsmittel stellt eine scharf riechende Flüssigkeit vor. In Wasser spaltet sich Blausäure ab, die durch die bei Blausäure angegebenen Reaktionen sich als solche charakterisieren läßt.

### 3. Chloreyan, CNCl.

Chloreyan ist ein farbloses, stechend riechendes, stark giftiges Gas, das mit Wasser in Salzsäure und Cyansäure, CNOH, zerfällt. Durch Einwirkung von Kalilauge bildet sich Kaliumcyanat und Chlorkalium. Kocht man die Lösung, so bildet sich Ammonium- und Kaliumcarbonat. Es muß sich also zur Feststellung von Chloreyan Salzsäure und Ammoniak nachweisen lassen.

### 4. Dicyan, CN—CN.

Dicyan ist ein farbloses Gas, das sich in Hochöfen bildet.

Wird das Gas durch verd. Kalilauge geleitet, so bildet sich Kaliumcyanid und -cyanat. Durch Nachweis dieser Salze (s. bei Chloreyan) läßt sich die Identität des Dicyans feststellen. Auch kann man das Gas durch Schwefelwasserstoff leiten. Es bilden sich alsdann gelbe, bzw. rote Krystalle, Flavean- bzw. Rubeanwasserstoff.

### 5. Calciumcyanamid, NC—NCa.

Das Calciumcyanamid findet als Düngemittel (Kalkstickstoff) Anwendung. Sein Nachweis läßt sich durch Aufschließen nach KJELDAHL erbringen. Man kann im Aufschluß Stickstoff, der als Ammoniak jetzt vorhanden ist, und Calcium, das jetzt als Sulfat vorliegt und durch eine Natrium-Kaliumcarbonatschmelze noch aufgeschlossen werden muß, nachweisen. Der KJELDAHL-Aufschluß kann auch zur quantitativen Bestimmung benutzt werden.

## III. Schwefelkohlenstoff und mit Wasserdämpfen flüchtige Halogenverbindungen.

Vorproben. Das Destillat aus weinsaurer Lösung kann außer den früher erwähnten Verbindungen Schwefelkohlenstoff und flüchtige Halogenverbindungen enthalten, die durch die Vorprobe nach VITALI und TORNANI<sup>1</sup> sich nachweisen lassen (Abb. 7).

<sup>1</sup> VITALI u. TORNANI: L'Orosi 7, 377; Arch. Pharm. 1885, 223, 234.

In einem kleinen KIPPSCHE Apparat wird gewaschener Wasserstoff entwickelt, der durch ein dickwandiges, weites Reagensglas mit seitlichem Stutzen geleitet wird; es ist mit einem zweifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung führt ein Glasrohr bis zum Boden des Reagensglases, durch das der Wasserstoff in dasselbe geleitet wird. Der rechtwinklig stehende Stutzen des Reagensglases ist mit einem rechtwinkligen Glasrohr

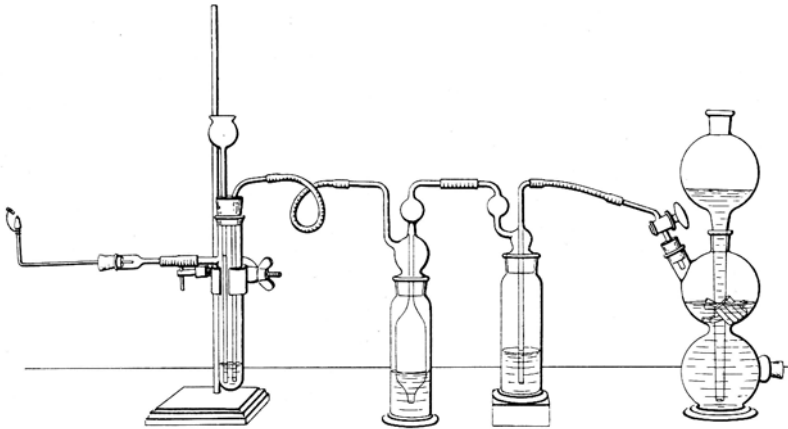


Abb. 7. Vorprobe auf Halogene und Schwefelkohlenstoff. (Nach VITALI und TORNANI.)

verbunden, an dessen oberem Ende eine Platinspitze angekittet ist, durch deren Öffnung die Gase entweichen können. In der zweiten Öffnung des Gummistopfens befindet sich ein Trichterrohr, das bis auf den Boden des Reagensglases führt. Vermittels eines Drahtes ist ein kleines Kupferoxydstäbchen so befestigt, daß es sich unmittelbar über der Platinspitze befindet und von der Wasserstoffflamme umspült werden kann, die das Kupferoxydstäbchen aber nur zum Glühen bringen darf.

Sobald man nun flüchtige Halogenverbindungen oder Schwefelkohlenstoff, einen kleinen Teil des bei der Untersuchung auf flüchtige giftige Verbindungen erhaltenen Destillates, durch das Trichterrohr in den Kolben bringt, tritt eine intensiv bläulich-grüne Färbung des Wasserstoffflämmchens auf. Diese Färbung ist verschieden, je nachdem ob es sich um Chloride, Jodide oder Schwefelkohlenstoff handelt, welch letzterer die Flamme bläulich färbt. Andere Halogenverbindungen, z. B. Chloralhydrat, können dadurch noch zum Nachweis gebracht werden, daß man Kalilauge durch das Trichterrohr gießt. Dadurch entstehen mit Wasserstoff sich verflüchtigende Halogenverbindungen, die alsdann die obige Reaktion auslösen.

Das Halogen selbst kann noch näher dadurch identifiziert werden, daß man die Verbrennungsgase über der Wasserstoffflamme mittels einer übergestülpten Absaugvorrichtung in Wasser auffängt und dieses auf die Halogene, Chlor, Brom und Jod, prüft.

Siedepunktsbestimmung. Handelt es sich um etwas größere Mengen einer isolierten Flüssigkeit, so kann man zur Feststellung des Siedepunktes den gewöhnlichen Fraktionskolben benutzen. Meist wird jedoch hierzu die isolierte Menge nicht ausreichen. In solchen Fällen kann man sich der Methode von SCHLEIERMACHER<sup>1</sup> bedienen.

Hierzu benutzt man den Apparat (Abb. 8), der etwa  $\frac{1}{4}$  der natürlichen Größe entspricht. Es ist bekannt, daß der Siedepunkt der Temperatur entspricht, bei der der Dampfdruck

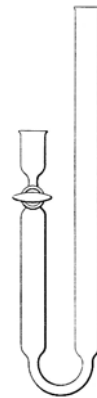


Abb. 8. Siedepunktbestimmungsapparat. (Nach SCHLEIERMACHER.)

<sup>1</sup> SCHLEIERMACHER: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1891, 24, 944.

gleich dem Atmosphärendruck ist. Man gießt durch den langen Schenkel des Apparates Quecksilber und öffnet vorsichtig den Hahn des kürzeren Schenkels; wenn der kürzere Schenkel einige Millimeter über dem Hahn mit Quecksilber gefüllt ist, so schließt man denselben. Man läßt nun durch seitliches Neigen des Schenkelrohres mit dem Hahn nach unten soviel Quecksilber auslaufen, daß nur der kürzere Schenkel mit Quecksilber gefüllt bleibt. Alsdann gibt man etwa 0,2 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit in den Trichter, öffnet vorsichtig den Hahn, läßt etwa 0,1 ccm in das Rohr eintreten, schließt den Hahn sofort und hängt den Apparat in ein größeres Becherglas, das je nach dem Siedepunkt der Flüssigkeit mit Wasser oder Paraffinöl gefüllt ist. Der kurze Schenkel muß völlig in die Flüssigkeit eintauchen. In dem Becherglas befindet sich ein Rührer und ein in 0,1 Grade eingeteiltes Thermometer. Man heizt nun das auf einer Asbestplatte stehende Becherglas langsam an und hält die Flüssigkeit durch den Rührer in Bewegung. Das Quecksilber wird aus dem kürzeren Schenkel nun in den langen Schenkel gedrückt. Der Siedepunkt der Flüssigkeit ist erreicht, wenn die Quecksilbersäule in beiden Schenkel gleich hoch steht. Bei vorsichtigem Erwärmen hält sich das Niveau der beiden Schenkel kurze Zeit. Die Temperatur, die das Thermometer anzeigt, wenn die Quecksilbersäulen sich auf das gleiche Niveau eingestellt haben, entspricht dem Siedepunkt der Flüssigkeit. Nach dem Abkühlen kann man ohne erneute Füllung den Versuch wiederholen.

### 1. Schwefelkohlenstoff.

In der Technik findet Schwefelkohlenstoff,  $CS_2$ , vielfach Anwendung, z. B. zum Extrahieren von Fetten usw. Der Schwefelkohlenstoff ist eine farblose, stark lichtbrechende Flüssigkeit von typischem Geruch.

Bei der Wasserdampfdestillation wird Schwefelkohlenstoff nur langsam übergetrieben, infolgedessen darf man die Destillationszeit nicht zu kurz bemessen. Wenn mehr Schwefelkohlenstoff vorhanden ist, so scheiden sich klare, farblose, stark lichtbrechende Öltröpfchen von charakteristischem Geruch ab. Siedepunkt =  $46^\circ$ , Dichte ( $15^\circ$ ) = 1,27.

#### a) Nachweis.

Zum Nachweis verwendet man einige Kubikzentimeter des Destillates oder man schüttelt ein im Destillat ausgeschiedenes Tröpfchen mit Wasser an und nimmt einige Kubikzentimeter hiervon.

$\alpha$ ) Reaktion mit Bleiacetat. Schüttelt man einige Kubikzentimeter des Destillates mit einigen Tropfen Bleiacetatlösung, so darf direkt eine Dunkel-färbung nicht eintreten, ebenfalls darf kein schwarzer Niederschlag sich bilden, der Schwefelwasserstoff anzeigen würde. Wird nun der farblosen Lösung Kalilauge zugesetzt, und die Lösung gekocht, so deutet eine Schwarzfärbung bzw. schwarzer Niederschlag auf Schwefelkohlenstoff hin.

$\beta$ ) Rhodanreaktion. Erwärmt man in einem Porzellanschälchen einige Kubikzentimeter des Destillates mit starkem Ammoniak, unter Zusatz von etwas Alkohol, und dampft die Lösung auf dem Wasserbade bis auf einige Kubikzentimeter ein, so bildet sich Rhodan. Den Rückstand verdünnt man mit etwas Wasser und fügt Salzsäure in geringem Überschuß zu. Bei Gegenwart von Schwefelkohlenstoff tritt auf Zusatz von einigen Tropfen sehr verdünnter Eisenchloridlösung eine blutrote Färbung auf.

$\gamma$ ) Xanthogenreaktion. Werden einige Kubikzentimeter des Destillates mit der dreifachen Menge konz. alkoholischer Kalilauge mehrere Minuten stark geschüttelt, dann mit Essigsäure schwach angesäuert und mit 1—2 Tropfen Kupfersulfatlösung versetzt, so entsteht bei Anwesenheit von Schwefelkohlenstoff zuerst ein schwärzlich brauner Niederschlag, der bald in gelbe Flocken

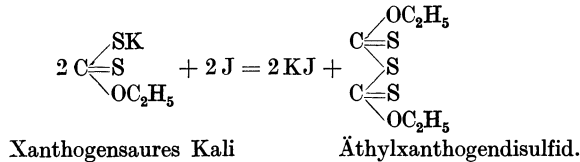
übergeht, die aus xanthogensaurem Kupferoxydul,  $C \begin{matrix} \swarrow SCu \\ - S \\ \searrow OC_2H_5 \end{matrix}$ , bestehen. Man kann auch nach VITALI so verfahren, daß man die alkoholische Anschüttelung mit verd. Schwefelsäure und Molybdänlösung versetzt. Tritt beim Erwärmen

eine Rotfärbung auf, so ist ebenfalls der Nachweis erbracht. Empfindlichkeit der Reaktion: 0,05 g in 1 ccm.

### b) Bestimmung.

Die Bestimmung beruht auf der Überführung von Schwefelkohlenstoff mittels alkoholischer Kalilauge in xanthogensaures Kalium, welches letzteres durch Titration mit Jodlösung bestimmt werden kann.

Dieses Verfahren läßt sich auch bei der Bestimmung von Schwefelkohlenstoff in der Luft anwenden. Im ersteren Falle wird ein aliquoter Teil des Destillates mit alkoholischer Kalilauge versetzt, in letzterem eine gemessene Menge Luft durch eine Kugelhöhre, die alkoholische Kalilauge enthält, gesogen. Zur Messung der Luft kann eine Gasuhr dienen oder man bestimmt die Kapazität einer Saugflasche, die man benutzt. In beiden Fällen wird die alkoholische Kalilauge mit 96% igem Alkohol auf ein bestimmtes Volum gebracht, einem aliquoten Teil Wasser hinzugesetzt und mit Essigsäure schwach angesäuert. Den Überschuß der Säure nimmt man mit Natriumbicarbonat weg und titriert unter Zusatz von Stärkelösung mit 0,1 oder 0,05 N.-Jodlösung bis zur Blaufärbung. Nach der Gleichung kommt auf 1 Mol Jod 1 Mol Xanthogensäure.



Nach RUPP und KRAUSS bildet sich auch noch Trithiokohlensäure, bzw. ihr Kaliumsalz,  $\begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} = \text{S} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{SH} \end{array}$ . Der Jodverbrauch ist der gleiche, wie bei der vorhergehenden Umsetzung.

1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,00760 g und 1 ccm 0,05 N.-Jodlösung = 0,0038 g Schwefelkohlenstoff.

## 2. Halogenverbindungen.

### a) Chloroform (Trichlormethan).

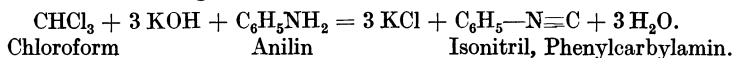
Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ , ist eine farblose, süßlich schmeckende Flüssigkeit von hohem Spez. Gewicht. In Wasser ist es wenig löslich, leichter in Alkohol.

Chloroform geht mit Wasserdämpfen leicht über und findet sich in den ersten Fraktionen des Destillates. Gut ist es, das Destillat in etwas Alkohol aufzufangen und für gute Kühlung bei der Destillation zu sorgen. Ein süßlicher Geschmack und Geruch ist für die Anwesenheit von Chloroform charakteristisch.

Siedepunkt = 60—62°. Dichte (15°) = 1,47—1,48.

#### α) Nachweis.

1. Isonitrilreaktion. Einige Kubikzentimeter des Destillates mit etwas alkoholischer Kalilauge und zwei Tropfen Anilin erwärmt, geben bei Anwesenheit von Chloroform einen sehr unangenehmen, typischen Geruch nach Isonitril. Es ist angebracht, eine Gegenprobe ohne Destillat anzustellen, da schon Anilin allein einen unangenehmen Geruch aufweist.



Schärfe des Nachweises: 0,2 g in 1 Liter.

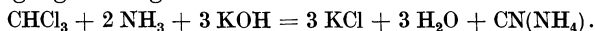


Die Reaktion ist für Chloroform nicht typisch, da auch Chloral, Bromal, Jodoform, Bromoform, Tetrachlorkohlenstoff u. a. m. diese Reaktion geben.

2. Resorcinreaktion nach SCHWARZ. Man löst etwa 0,1 g Resorcin in 2 ccm Wasser, setzt einige Tropfen 15% ige Natronlauge und einige Kubikzentimeter des Destillates zu. Ist Chloroform zugegen, so tritt nach dem Sieden eine gelbrote Färbung auf, die zuweilen fluoresciert. Diese Reaktion ist ebenfalls nicht eindeutig.

3. Naphtholreaktion nach LUSTGARTEN. Löst man etwa 0,05 g  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Naphthol in etwa 2 ccm konz. Kalilauge auf, erwärmt auf 50° und setzt nun einige Kubikzentimeter Destillat hinzu, so tritt bei Anwesenheit von Chloroform eine Blaufärbung ein, die bei Benutzung von  $\beta$ -Naphthol weniger beständig ist. Durch Zusatz von verd. Säure entsteht ein ziegelroter Niederschlag. Die Reaktion ist ebenfalls nicht eindeutig.

4. Cyanreaktion. Schmilzt man in einem Glasrohr einige Kubikzentimeter Destillat mit etwas festem Chlorammonium und alkoholischer Kalilauge ein und erhitzt einige Stunden im Wasserbad, so bildet sich Blausäure, bzw. ihr Ammoniumsalz. Das Druckrohr darf nur bis zu etwa  $\frac{1}{4}$  gefüllt sein. Der Reaktionsvorgang ist folgender:



Die gebildete Blausäure kann durch die Berlinerblaureaktion nachgewiesen werden (s. Blausäure S. 1288).

5. Reduktionsnachweis. Das Destillat reduziert beim Kochen FEHLINGsche Lösung und ammoniakalische Silberlösung. Auch diese Reaktionen sind nicht eindeutig.

### $\beta$ ) Bestimmung.

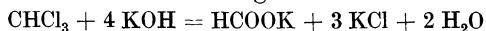
1. Die gut zerkleinerten und abgewogenen Leichenteile werden mit Wasser vermischt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Die Destillation ist solange fortzuführen, bis einige Kubikzentimeter des Destillates keine Isonitrilreaktion mehr geben. Um freie Salzsäure, die etwa mit überdestilliert ist, zu binden, wird das Destillat mit sehr wenig Kaliumcarbonat versetzt, die Flüssigkeit auf 60° erwärmt und mit Wasser gewaschene Luft durchgesogen. Das Gemenge von Luft und Chloroformdämpfen leitet man durch ein glühendes Verbrennungsrohr. In der Glühhitze zerfällt das Chloroform bei Gegenwart von Wasser in Kohlenoxyd, Ameisensäure und Salzsäure.



Dieses Gasgemisch wird nun in mit Salpetersäure angesäuerte Silbernitratlösung geleitet und entweder das Chlorsilber zur Wägung gebracht, oder die Lösung, falls gemessene Silbernitratlösung vorgelegt wurde, nach VOLHARD titriert. Titrimetrisch zeigt 1 ccm 0,1 N.-Silbernitratlösung 0,00398 g Chloroform an. Gewichtsanalytisch zeigen 3 Mol AgCl 1 Mol Chloroform an.  $3 \text{AgCl} : \text{CHCl}_3 = \text{gefundenere Menge AgCl} : x$ .

2. Man kann auch in das Verbrennungsrohr chlorfreies, aus Marmor hergestelltes Calciumoxyd bringen. Nach 1—2stündigem Durchleiten der Gase durch das glühende Rohr wird das Calciumoxyd in Salpetersäure gelöst und die aus dem Chloroform gebildete Salzsäure durch Titration mit Silbernitrat nach VOLHARD bestimmt.

3. Oder es wird durch Erhitzen eines aliquoten Teiles des chloroformhaltigen, durch nochmalige Destillation gereinigten Destillates mit alkoholischer Kalilauge am Rückflußkühler auf dem Wasserbade das Chloroform in Ameisensäure und Salzsäure nach der Gleichung



gespalten, und nach dem Abdampfen des Alkohols der Rückstand mit Wasser

aufgenommen, mit Salpetersäure angesäuert und die gebildete Salzsäure mit Silbernitrat als Chlorsilber gefällt und zur Wägung gebracht oder nach Zusatz von einer überschüssig, gemessenen 0,1 oder 0,05 N.-Silbernitratlösung nach VOLHARD titriert.  $3 \text{ Mol AgCl} = 1 \text{ Mol CHCl}_3$ .

#### b) Bromoform (Tribrommethan, Brommethyl).

Das Bromoform,  $\text{CHBr}_3$ , ist eine spezifisch schwere, aromatisch riechende Flüssigkeit, die starke Lichtbrechung zeigt. Bei der Destillation verfähre man wie beim Chloroform.

Siedepunkt = 149—150°. Dichte (15°) = 2,8—2,9.

Nachweis. Bromoform gibt die gleichen Reaktionen wie Chloroform. Beim Kochen mit alkoholischer Kalilauge bildet sich Bromkalium, welches letzteres mittels Silbernitratlösung identifiziert werden kann.

Die Bestimmung kann wie beim Chloroform unter 3. erfolgen. Zur Wägung wird Bromsilber gebracht, oder der Silberüberschuß nach VOLHARD zurückgemessen.  $3 \text{ Mol AgBr} = 1 \text{ Mol CHBr}_3$ .

#### c) Jodoform (Trijodmethan).

Das Jodoform,  $\text{CHI}_3$ , besteht entweder aus gelben, hexagonalen Krystallen oder es stellt ein gelbes Pulver vor, das einen stark typischen Geruch besitzt. Bei der Isolierung des Jodoforms durch Destillation wird das Wasser, wenn es sich um mehr als Spuren handelt, weißlich getrübt. Man kann durch Äther das Jodoform aus dem wäßrigen Destillat ausschütteln. Es ist das Destillat vor dem Ausschütteln schwach alkalisch zu machen. Nach dem Verdunsten des Äthers verbleibt das Jodoform in hexagonalen Krystallen, die unter dem Mikroskop leicht erkennbar sind, zurück. Schmelzpunkt = 120°.

Nachweis. Das Destillat hat den typischen Jodoformgeruch. Die Reaktionen auf Chloroform treffen auch meistens hier zu.

Reaktion nach LUSTGARTEN. In einem engen Reagensglas löst man etwas Phenol in einigen Tropfen alkoholischer Kalilauge, fügt hierzu etwas Verdunstungsrückstand, der durch Ausschütteln des Destillates mit Äther gewonnen wurde, zu und erhitzt über ganz kleiner Flamme. Es bildet sich bei Anwesenheit von Jodoform am Boden des Reagensglases ein roter Beschlag, der in einigen Tropfen verdünnten Alkohols mit carminroter Farbe löslich ist.

In gleicher Weise wie bei Bromoform, läßt sich bei Jodoform durch Kochen mit alkoholischer Kalilauge das Jod in Jodwasserstoff überführen und nachweisen.

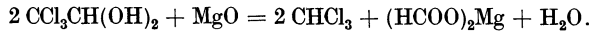
Zur Bestimmung kann man die ätherische Lösung im Vakuum über Schwefelsäure verdunsten und den Rückstand zur Wägung bringen.

#### d) Chloralhydrat (Trichloracetaldehyd).

Das Chloralhydrat,  $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ , bildet farblose Krystalle von stechendem Geruch und schwach bitterem, brennendem Geschmack. Infolge seiner leichten Löslichkeit befindet es sich im wäßrigen Destillat gelöst. Schmelzpunkt: Bei 49° sintern die Krystalle und bei 53° tritt Schmelzen ein. Es ist darauf zu achten, daß vor der Destillation nur eine schwach saure Reaktion vorherrscht.

Nachweis: Sämtliche Reaktionen des Chloroforms zeigt auch das Chloralhydrat. — Beim Nachweis des Chloralhydrats nach VITALI-TORNANI gibt es keine Blau-Grünfärbung; diese tritt erst nach Zusatz von Alkali ein. Die NESSLERSche Reaktion ist positiv. Diese beiden Reaktionen zeigen Unterschiede gegenüber dem Chloroform und können somit zur näheren Identifizierung des Chloralhydrats dienen.

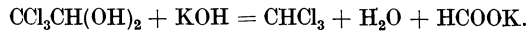
Liegt eine genügende Menge isolierten Materials vor, so kann man das Destillat mit etwas Magnesiumoxyd  $\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler kochen und die Zersetzungsprodukte, das Chloroform und die Ameisensäure, nachweisen (s. S. 1295 und 1317).



**Bestimmung.** Ein aliquoter Teil des Destillates wird mit überschüssiger alkoholischer Kalilauge 5—6 Stunden am Rückflußkühler erhitzt und alsdann auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wird in Wasser gelöst, mit verd. Salpetersäure angesäuert und das Chlor durch Silbernitrat gefällt. Entweder wird das Halogensilber zur Wägung gebracht oder, wenn man gemessene Silbernitratlösung angewendet hat, nach VOLHARD titriert. Nach nachstehender Formel zeigen 3 Chlor ein Mol Chloralhydrat an.



Es zerfällt zuerst das Chloralhydrat in Chloroform, das dann weiter aufgespalten wird.



### Bildung von Urochloralsäure.

Vielfach gelingt es wegen der leichten Zersetzlichkeit des Chlorhydrates nicht mehr, solches in Leichenteilen nachzuweisen. In solchen Fällen ist es unter Umständen noch möglich, Urochloralsäure im Harn nachzuweisen. Die Urochloralsäure ist eine gepaarte Glucuronsäure (Trichloräthylglucuronsäure)  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{O}_7$ . Sie bildet farblose seidenglänzende Nadeln, die in Wasser und Alkohol leicht löslich sind. — Schmelzpunkt =  $142^\circ$ ;  $[\alpha]_D = -60^\circ$ . — Die Isolierung aus dem Harn geschieht am besten nach v. MEHRING und MUSKULUS<sup>1</sup>: Man engt den Harn auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein und verrührt mit verd. Schwefelsäure. Alsdann extrahiert man mehrmals mit einem Äther-Alkoholgemisch (3 Tle. Äther und 1 Tl. Alkohol) und unterwirft den Auszug der Destillation. Der Rückstand wird vorsichtig mit Kalilauge neutralisiert, eingedampft, mit 90%igem Alkohol aufgenommen und vom Ungelösten abfiltriert. Das Filtrat fällt man mit Äther, wäscht den Niederschlag mit einem Gemisch von Alkohol und Äther aus und trocknet ihn im Vakuum über Schwefelsäure. Nach dem Trocknen kocht man den Rückstand mit absol. Alkohol aus und filtriert ihn noch heiß. Wenn sich nach dem Erkalten farblose, seidenglänzende Nadeln in Büscheln ausscheiden, so liegt das Kaliumsalz der Urochloralsäure vor. Die Krystalle trocknet man im Vakuum über Schwefelsäure, wäscht sie zur Entfernung der letzten Spuren von Verunreinigung mit einem Gemisch von Alkohol und Äther aus und streicht den Krystallbrei auf einen Tonteller. Die so gereinigten Krystalle werden in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit verd. Salzsäure schwach angesäuert und mit einer Mischung von 2 Tln. Äther und 1 Tl. Alkohol ausgeschüttelt. Nach einiger Zeit krystallisiert das gebildete Chlorkalium aus. Durch Zusatz von weiteren Äthermengen und Stehenlassen erreicht man eine völlige Ausscheidung des Chlorkaliums, die nach etwa 2—3 Tagen beendet ist. Die Äther-Alkohollösung des Filtrates wird zur Entfernung des Alkohols und Äthers destilliert und der Rückstand mit soviel feuchtem Silberoxyd versetzt, bis alles Chlor als Chlorsilber ausgefällt ist. Das ausgeschiedene Chlorsilber wird abfiltriert und zur Ausfällung des überschüssigen Silbers Schwefelwasserstoff eingeleitet und das klare Filtrat vorsichtig bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. In der Ruhe scheiden sich nach einigen Stunden farblose, seidenglänzende Nadeln der Urochloralsäure aus.

**Nachweis:** Eine wäßrige Lösung dreht das polarisierte Licht nach links. Der Schmelzpunkt liegt bei  $142^\circ$ . Die Lösung selbst reagiert stark sauer und reduziert FEHLINGSche Lösung. Beim Erhitzen färbt sich die Säure unter Caramelgeruch gelb. Erhitzt man die Säure 2—3 Stunden mit 7%iger Salzsäure oder Schwefelsäure am Rückflußkühler, so bilden sich Trichloräthylalkohol und Glucuronsäure. Der Trichloräthylalkohol siedet bei  $151^\circ$ .

Die meisten Chloralhydrat enthaltenden Arzneimittel spalten in saurer Lösung bei der Destillation Chloral ab, das alsdann nachgewiesen werden kann.

<sup>1</sup> v. MEHRING u. MUSKULUS: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1875, 8, 662; 1882, 15, 1020.

## e) Bromal (Bromalhydrat).

Das Bromal,  $\text{CBr}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ , bildet farblose Krystalle vom Schmelzpunkt  $53,5^\circ$ .

Das Bromal verhält sich wie das Chloral bzw. Chloralhydrat. Es spaltet die entsprechende Bromverbindung, das Bromoform,  $\text{CHBr}_3$ , ab.

## f) Seltener bei Vergiftungen beobachtete Halogenverbindungen.

Solche Verbindungen sind: Methylenechlorid, Tetrachlorkohlenstoff, Äthylenechlorid, Äthylidenechlorid, Trichloräthylen. Für ihren Nachweis sind folgende Konstanten und Reaktionen von Wichtigkeit (Tabelle von GADAMER, für Trichloräthylen erweitert):

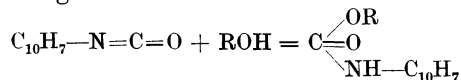
| Verbindung  | Siedepunkt     | Spez. Gewicht bei $15^\circ$ | Isonitril-Reaktion | Konz. Schwefelsäure | Erwärmen mit alkoholischer Kalilauge        |
|---|----------------|------------------------------|--------------------|---------------------|---|
| Methylenechlorid ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) . . .               | 40—41 $^\circ$ | 1,35                         | negativ            | bräunt nicht        | Formaldehyd                                 |
| Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) . . . . .                          | 62 $^\circ$    | 1,5                          | positiv            | „                   | Kaliumformiat                               |
| Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ) . . .                    | 77—78 $^\circ$ | 1,6                          | „                  | „                   | Kaliumcarbonat                              |
| Äthylenechlorid ( $\text{CH}_2\text{Cl} - \text{CH}_2\text{Cl}$ ) | 85 $^\circ$    | 1,25                         | negativ            | „                   | Schon in der Kälte Geruch nach Vinylchlorid |
| Äthylidenechlorid ( $\text{CH}_3 - \text{CHCl}_2$ )               | 58,5 $^\circ$  | 1,18                         | „                  | bräunt              | Vinylchlorid und Acetal                     |
| Trichloräthylen ( $\text{CCl}_2 = \text{CHCl}$ ) .                | 88 $^\circ$    | 1,47                         | positiv            | gelblich            | —   |

In neuerer Zeit sind Vergiftungsfälle mit Bromäthyl,  $\text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{Br}$ , Siedepunkt  $36 - 38,5^\circ$ , beobachtet worden. Als Narkoticum findet Äthylenechlorid,  $\text{CH}_2\text{Cl} - \text{CH}_2\text{Cl}$ , Anwendung.

## IV. Alkohole.

Die Alkohole sind mit Wasserdämpfen flüchtig und können nach NEUBERG<sup>1</sup> mittels  $\alpha$ -Naphthylisocyanat nachgewiesen werden. Das Destillat wird zur Anreicherung einer fraktionierten Destillation mit einem gut wirkenden Destillationsaufsatz unterworfen. Die so gewonnene Fraktion wird alsdann mit Calciumoxyd oder entwässertem Kupfersulfat entwässert und mit etwas weniger als einem Äquivalent  $\alpha$ -Naphthylisocyanat bei Abschluß von Feuchtigkeit in einem Reagensglas mit Steigrohr erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird dann mit Ligroin ausgekocht. Ein kleiner Teil bleibt ungelöst. Es handelt sich um Dinaphthylharnstoff, der sich aus dem  $\alpha$ -Naphthylisocyanat gebildet hat. Die gebildete Urethanverbindung löst sich in dem Ligroin und krystallisiert aus dem Lösungsmittel aus. Durch Bestimmung des Schmelzpunktes und evtl. noch eine Stickstoffbestimmung, nach KJELDAHL, läßt sich der betreffende Alkohol identifizieren.

Die Reaktion ist folgende:



Gewisse Schwierigkeiten bestehen bei geringen Mengen, da der nachzuweisende Alkohol völlig wasserfrei sein muß. In solchen Fällen kommt man zum Ziele, wenn man mittels p-Nitrobenzoylchlorid den betreffenden Ester herstellt, der durch seinen Schmelzpunkt charakterisiert werden kann; s. unter Äthylalkohol, S. 1303.

<sup>1</sup> NEUBERG: Biochem. Zeitschr. 1909, 20, 445.

## Schmelzpunkte der Urethane.

|                                  |              |                                   |          |                             |        |
|----------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------|-----------------------------|--------|
| Methylalkohol . . . . .          | 117,5—118,0° | n-Butylalkohol . . . . .          | 71— 72°  | Iso-Amylalkohol . . . . .   | 67—68° |
| Äthylalkohol . . . . .           | 79— 79,5°    | Iso-Butylalkohol . . . . .        | 103—105° | 1-Amylalkohol . . . . .     | 82°    |
| n-Propylalkohol . . . . .        | 80°          | Sec. Butylalkohol . . . . .       | 97— 98°  | Sec. Amylalkohol . . . . .  | 76—79° |
| Iso-Propyl-<br>alkohol . . . . . | 105—106°     | Tert. Butyl-<br>alkohol . . . . . | 100—101° | Tert. Amylalkohol . . . . . | 71—72° |
|                                  |              |                                   |          | Allylalkohol . . . . .      | 109°   |

## 1. Methylalkohol (Methanol), $\text{CH}_3 \cdot \text{OH}$ .

(Eigenschaften s. S. 990 und Bd. I, S. 1051.)

### a) Nachweis.

$\alpha$ ) Nachweis als Methylalkohol. Durch Destillation läßt sich der Methylalkohol mit Wasserdämpfen übertreiben. Bei Leichenteilen wird man am besten nach A. JUCKENACK<sup>1</sup> die Destillation in folgender Weise vornehmen: Die gut zerkleinerten und, wenn notwendig, mit Wasser versetzten Leichenteile werden mit soviel Natriumchlorid versetzt, daß eine 15—20% ige Lösung entsteht. Alsdann destilliert man unter vorheriger Ansäuerung mit Phosphorsäure im Ölbad ohne Wasserdampf durchzuleiten bei 150° langsam die Hälfte an Gewicht der angewandten Leichenteile ab. Dieses Destillat prüft man nach HEHNER (s. S. 1308) auf Anwesenheit von Formaldehyd. Verläuft die Reaktion negativ, so verfährt man in der Weise weiter, daß man das Destillat durch Filtration von den mitüberdestillierten und sich später abscheidenden Fettsäuren befreit, mit Natriumcarbonat neutralisiert und wieder soviel Natriumchlorid zusetzt, daß eine etwa 20% ige Lösung entsteht. Alsdann destilliert man hiervon etwa  $\frac{1}{3}$  ab. Den Destillationsrückstand hebt man zur Prüfung auf Ameisensäure auf.

Fiel die Prüfung auf Formaldehyd positiv aus, so muß die erste Destillation aus den Leichenteilen nach JUCKENACK alkalisch gemacht und etwas Silbernitrat zugesetzt werden, damit vorhandene Aldehyde und Glycerin zerstört werden. Alsdann wird von diesem Destillat erneut  $\frac{1}{3}$  zur weiteren Verarbeitung auf Methylalkohol abdestilliert. Bei der Verwesung von Leichen wird nach JUCKENACK aus Methylalkohol kein Formaldehyd gebildet. Notwendig ist es, dem zweiten Destillat etwas Äthylalkohol zuzusetzen, wenn man darin nicht direkt den Methylalkohol nachweisen, sondern diesen erst zu Formaldehyd oxydieren will.

Nachweis. Wenn man nun den Methylalkohol als solchen fassen und nachweisen will, so verfährt man in der Weise, daß man das direkt gewonnene oder das nach JUCKENACK erhaltene Destillat einer fraktionierten Destillation mit gut wirkendem Aufsatz unterwirft. Das so erhaltene Destillat wird zur Entfernung noch vorhandenen Wassers mit ausgeglühtem Calciumcarbonat versetzt und die Flüssigkeit alsdann noch am Rückflußkühler unter Zusatz von Calciumoxyd gekocht. Siedepunkt und Spez. Gewicht müssen alsdann dem des reinen Methylalkohols entsprechen. Diese Reinigung ist nur möglich, wenn es sich um größere Mengen Methylalkohol handelt, wie sie wohl nie aus Leichenteilen isoliert werden können.

Um kleinere Mengen Methylalkohol zu fassen und nachzuweisen, bedient man sich der Methode von AUTENRIETH<sup>2</sup>. Das direkt oder nach JUCKENACK erhaltene Destillat wird, wie oben beschrieben, nachdem es neutralisiert und mit Natriumchlorid versetzt wurde, der nochmaligen Destillation unterworfen und etwa 40—50 ccm davon abdestilliert. Diese Menge bringt man in ein Glasstöpselgefäß, setzt etwa 10 ccm 10% ige Natronlauge

<sup>1</sup> A. JUCKENACK: Z. 1912, 24, 7.

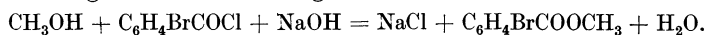
<sup>2</sup> AUTENRIETH: Arch. Pharm. 1920, 258, 1.

zu und erwärmt das Gemisch auf etwa 40—50°, setzt alsdann 1—3 g zerriebenes p-Brombenzoylchlorid zu und schüttelt solange in der Schüttelflasche kräftig durch, bis die Flüssigkeit erkaltet ist. Ist Methylalkohol zugegen, so scheidet sich der p.-Brombenzoesäuremethylester als weiße, krümelige Masse ab. Man muß beim Schütteln von Zeit zu Zeit die Reaktion des Gemisches prüfen; sie muß immer schwach alkalisch gehalten werden. Die weiße Masse wird mit Wasser gewaschen und auf einen Tonteller gestrichen.

Man kann auch durch Ausschüttelung mit Äther den Ester von der wäßrigen Lösung trennen; zweimalige Ausschüttelung mit je 10 ccm Äther genügt. Nach dem Entwässern der ätherischen Lösung mit etwas geschmolzenem Chlorcalcium läßt man sie in einem Glasschälchen verdunsten. Um ein ganz reines Präparat zu erhalten, kann der gesammelte Ester aus Äthylalkohol oder Aceton umkristallisiert werden. 0,3 g des Esters lösen sich in 14 ccm Alkohol und scheiden auf Zusatz von Wasser und Einstellen in Eis 0,26 g des Esters wieder aus.

Phenole, Kresole und Ammoniak stören die Reaktion insofern, als diese Körper das p-Brombenzoylchlorid unter Bildung krystallisierbarer Verbindungen zersetzen. Gibt das gewonnene zweite Destillat nach JUCKENACK mit MILLONSCHEM Reagens nach vorherigem Erwärmen eine Reaktion auf Phenole, also Rotfärbung, so muß nach Zusatz von Natronlauge eine nochmalige Destillation vorgenommen werden. Ist Ammoniak vorhanden, so muß das Destillat angesäuert und nochmals destilliert werden.

Falls Methylalkohol zugegen ist, so riecht der isolierte Ester anisartig und hat einen Schmelzpunkt von 78—79°. Unter Umständen kann auch eine Brombestimmung nach CARIUS ausgeführt werden.



Schärfe des Nachweises 0,05—0,1 g.

β) Nachweis durch Oxydation zu Formaldehyd. Wenn man Methylalkohol als solchen nicht nachweisen will, so kann man ihn nach verschiedenen Methoden zu Formaldehyd oxydieren. Man nimmt hierzu einen aliquoten Teil des nach JUCKENACK erhaltenen zweiten Destillates, das durch mehrfache Destillation in saurer und alkalischer Lösung weiter gereinigt wurde, und oxydiert den Methylalkohol zu Formaldehyd. Nach FENDLER und MANNICH soll auch Äthylalkohol geringe Mengen Formaldehyd bei der Oxydation geben. Den Nachweis von Formaldehyd s. S. 1308.

γ) Oxydation mit einer rotglühenden Kupferspirale. Man taucht mehrmals eine glühende Kupferspirale in das Destillat, das sich in einem Reagensglas befindet. Hierdurch wird der Methylalkohol zu Formaldehyd oxydiert, dessen Geruch charakteristisch ist.

δ) Oxydation mit Permanganat nach JUCKENACK<sup>1</sup>. 5—10 ccm des Destillates werden mit dem gleichen Volum verd. Schwefelsäure versetzt und allmählich nach und nach in kleinen Mengen fein zerriebenes Kaliumpermanganat eingetragen. Falls nach der ersten Zugabe keine baldige Reduktion eintritt, so setzt man das Reagensglas kurze Zeit in ein Wasserbad von 50°. Ist die Reduktion eingetreten, so fährt man mit dem Permanganatzusatz solange fort, bis etwa 5 Minuten lang die rote Permanganatfärbung bestehen bleibt. Alsdann stellt man das Reagensglas einige Zeit in ein Wasserbad von 50° und filtriert vom ausgeschiedenen Mangandioxyd ab. Bleibt eine schwache Rosafärbung des Filtrates bestehen, so kann diese durch einige Tropfen Äthylalkohol oder etwas Oxalsäure weggenommen werden. Das klare, farblose Filtrat wird dann auf Formaldehyd geprüft. Nachweis s. S. 1308.

ε) Oxydation nach G. DENIGÈS. Die Oxydation wird ebenfalls mit Permanganat vorgenommen. Zur Entfärbung wird Oxalsäure benutzt. Falls es sich um Leichenteile handelt, setzt man zur Verschärfung des Nachweises und

<sup>1</sup> JUCKENACK: Z. 1912, 24, 7.

Begünstigung des Reaktionsverlaufes einige ccm reinen Äthylalkohol zu, was bei Branntweinen nicht notwendig ist.

5 ccm des Destillates, dessen Gehalt 3—4% Methylalkohol nicht überschreitet, wird mit 0,2 ccm reinstem Äthylalkohol, wenn solcher nicht schon zugesetzt worden ist, versetzt. Alsdann fügt man 2 ccm 3%ige Kaliumpermanganatlösung und 0,4 ccm Schwefelsäure zu. Nach 2—3 Minuten wird mit kaltgesättigter Oxalsäurelösung und 1 ccm Schwefelsäure Entfärbung bewirkt. Besser ist es, nach KOLTHOFF<sup>1</sup> bei der Oxydation an Stelle von Schwefelsäure 1,5—2,0 ccm 4fach N.-Phosphorsäure zu nehmen, die Reaktion erfordert 15 Minuten. Diese farblose Lösung kann nun auf Formaldehyd geprüft werden. Nachweis s. S. 1309.

ζ) Oxydation mit Platinschwarz<sup>2</sup>. Einige Kubikzentimeter des Destillates werden in einem Kölbchen mit frisch gefälltem Platinschwarz versetzt und eine Stunde lang geschüttelt. Durch diese Manipulation wird der Methylalkohol zu Formaldehyd oxydiert. Nachweis s. S. 1308.

In Branntweinen kann der Methylalkohol direkt oder besser nach vorheriger Destillation und nötigenfalls Aussalzung zur Entfernung der ätherischen Öle durch Oxydation zu Formaldehyd als solcher nachgewiesen werden. Hierüber berichten FENDLER und MANNICH<sup>3</sup> und ferner PFYL, REIF und HANNER<sup>4</sup>. E. DINSLAGE und O. WINDHAUSEN<sup>5</sup> bringen eine kritische Zusammenstellung des Methylalkoholnachweises. Tinkturen und Liköre werden vor der Oxydation destilliert. Das Destillat ist alsdann mit 20%iger Schwefelsäure und etwas Kieselgur kräftig zu schütteln und nach der Filtration der Methylalkohol zu Formaldehyd zu oxydieren. Nachweis s. S. 1308.

### b) Bestimmung.

α) Durch Bestimmung des Spez. Gewichtes der gereinigten und durch fraktionierte Destillation konzentrierten Destillate.

β) Nach LANGE und REIF<sup>6</sup> kann der Methylalkoholgehalt durch refraktometrische Bestimmung ermittelt werden. Diese Methode ist nur bei größeren Mengen anwendbar, wie sie wohl in Leichenteilen nicht vorkommen dürften. Näheres s. S. 994.

γ) Nach AUTENRIETH (S. 1300) kann man den isolierten p-Brombenzoesäureäthylester zur Wägung bringen und so annähernd den Gehalt bestimmen.

δ) Durch colorimetrische Bestimmung des Methylalkohols nach vorheriger Oxydation zu Formaldehyd (S. 1310).

ε) Die Oxydation des Methylalkohols zu Kohlensäure ist ebenfalls zur Bestimmung ausgearbeitet worden, unter anderem z. B. nach der Methode von HEIDUSCHKA und WOLF<sup>7</sup> (S. 998). Wenn auch Äthylalkohol nicht wie Formaldehyd zu Kohlendioxyd oxydiert wird, so werden doch zweifellos, namentlich bei Leichenteilen, mitüberdestillierte andere Substanzen zu Kohlensäure oxydiert, die einen höheren Gehalt an Methylalkohol vortäuschen können.

<sup>1</sup> KOLTHOFF: Pharm. Weekblad 1922, 59, 1268.

<sup>2</sup> A. PERATONER u. A. TAMBURELLO: Giorn. d. Scienze Nat. et Econ. 1905, 25, 272.

<sup>3</sup> FENDLER u. MANNICH: Ministerialerlaß vom 20. VI. 1905 betr. Nachweis von Holzgeist in brantweinhaltenen Arzneimitteln.

<sup>4</sup> PFYL, REIF u. HANNER: Z. 1921, 42, 218.

<sup>5</sup> E. DINSLAGE u. O. WINDHAUSEN: Z. 1926, 52, 117.

<sup>6</sup> LANGE u. REIF: Z. 1921, 41, 216.

<sup>7</sup> HEIDUSCHKA u. WOLF: Pharm. Zentralh. 1920, 61, 361.

## 2. Äthylalkohol (Äthanol), $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$ . (Eigenschaften S. 1004 und Bd. I, S. 1050.)

### a) Nachweis.

Der Nachweis in dem Destillat kann, wenn genügend Material vorliegt, das durch fraktionierte Destillation und Entwässerung mit frischgeglühtem Ätzkalk sich reinigen läßt, durch seine physikalischen Konstanten erbracht werden. Zu bemerken ist, daß in faulenden Leichen sich nicht unerhebliche Mengen Äthylalkohol bilden.

$\alpha$ ) LIEBENSche Jodoformreaktion. Einige Kubikzentimeter des Destillates werden mit Natronlauge alkalisch gemacht, auf  $60^\circ$  erwärmt und in kleinen Mengen fein zerriebenes Jod nach und nach zugesetzt. Die Lösung trübt sich weißlich und scheidet kleine, gelbe, hexagonale Kryställchen aus. Es tritt zugleich der typische Jodoformgeruch auf. Tritt die Reaktion nicht ein, so kann man etwas Jodkalium und Kaliumpersulfat zusetzen. Auf diese Weise gelingt es wohl, noch geringe Mengen Alkohol nachzuweisen; die LIEBENSche Reaktion wird auch durch viele andere Körper, wie Aceton, Essigäther u. a. m. hervorgerufen.

$\beta$ ) VITALISChe Reaktion. Ausführung wie bei Schwefelkohlenstoff (S. 1294) beschrieben, nur daß man keinen Alkohol, sondern etwas Schwefelkohlenstoff zusetzt. Acetaldehyd und Acetessigsäure geben eine ähnliche Reaktion.

$\gamma$ ) BERTHELOTSche Probe. Schüttelt man einige Kubikzentimeter des Destillates kräftig mit Benzoylchlorid und läßt einige Minuten stehen, so bildet sich bei Gegenwart von Äthylalkohol der Benzoesäureäthylester. Um das überschüssige Benzoylchlorid zu zersetzen, damit es bei der Sinnenprüfung nicht störend wirkt, gibt man einige Kubikzentimeter Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion zu. Jetzt tritt bei Gegenwart von Äthylalkohol der charakteristische, angenehme Estergeruch auf. Man kann an Stelle des Benzoylchlorids auch p-Nitrobenzoylchlorid verwenden. Die Anwendung ist die gleiche, wie eben beschrieben. Wenn man das Reaktionsprodukt einige Zeit stehen läßt, damit die Umsetzung zu Ende geführt wird, so kann man den p-Nitrobenzoesäureäthylester gewinnen, der nach der Umkrystallisation durch seinen Schmelzpunkt ( $57^\circ$ ) noch weiter zu charakterisieren ist.

$\delta$ ) TAYLOR-BUCHHEIMSche Probe. Die Reaktion beruht auf der Oxydation des Äthylalkohols durch Platinmohr als Katalysator. Unter eine dicht schließende tubulierte Glasglocke setzt man ein Schälchen mit einigen Kubikzentimetern des Destillates und darüber ein Schälchen mit etwas Platinmohr. Die Alkoholdämpfe werden durch Platinmohr zu Essigsäure oxydiert. Es tritt nach einiger Zeit in der Glasglocke ein Geruch nach Essigsäure auf. Zugleich ist auch ein Geruch nach Acetaldehyd bemerkbar. Blaues Lackmuspapier, das in die Nähe des Platinmohres gelegt wird, rötet sich.

Eine einwandfreie Deutung lassen die Reaktionen  $\gamma$  und  $\delta$  zu.

### b) Bestimmung.

Meist wird man von der quantitativen Bestimmung absehen können, da in Leichenteilen, sofern es sich um solche handelt, infolge der leichten Zersetzbarkeit des Alkohols größere Mengen dem Nachweis bzw. der Isolierung entgehen. Durch fraktionierte Destillation mit gut wirkenden Destillationsaufsätzen ist man mit Hilfe des Spez. Gewichtes in der Lage, in dem Destillat die Alkoholmenge zu bestimmen.



## Bestimmung des Alkohols im Blut.

Die Feststellung einer alkoholischen Beeinflussung hat durch die Verschärfung der Kraftverkehrsordnung, nach der eine unter der Wirkung geistiger Getränke stehende Person kein Kraftfahrzeug führen darf, namentlich also auch bei Autounfällen, eine erhöhte Bedeutung erlangt. Sie erfolgt durch die Bestimmung des Alkohols im Blut der betreffenden Person.

1. Verfahren von WIDMARK<sup>1</sup>. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, daß man in besonderen Fläschchen (Abb. 9) Blut bei 50—60° zur Verdampfung bringt, wobei der Alkohol von einer genau gemessenen, räumlich getrennten Menge Kaliumbichromat-Schwefelsäure oxydiert wird; aus dem Verbrauch an Bichromat berechnet man die Menge Alkohol. Erforderlich sind:

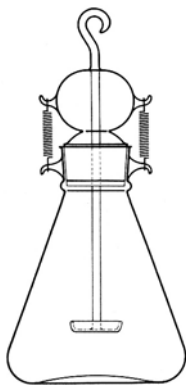


Abb. 9. Alkoholbestimmungskölbchen.  
(Nach WIDMARK.)

1. Eine Lösung von 0,2 g Kaliumbichromat in 100,0 ccm konz. Schwefelsäure. (Das Bichromat wird in 1 ccm Wasser gelöst und dann mit Schwefelsäure bis zur Marke aufgefüllt.)

2. Eine 0,01 N.-Thiosulfatlösung, jedesmal frisch zu bereiten; ihr Titer wird mit 0,01 N.-Bichromatlösung festgestellt.

3. Eine 1%ige Stärkelösung, mit Natriumchlorid gesättigt.

4. Eine 5%ige Jodkaliumlösung, aus jodatfreiem Jodkalium bereitet.

Die Kölbchen sind peinlich zu reinigen und zu trocknen; man spült sie zunächst mit Bichromat-Schwefelsäuremischung, dann mit dest. Wasser gut aus, läßt einige Minuten Wasserdampf hindurchströmen und trocknet sie dann im Trockenschrank.

Das genaue Abmessen der Bichromat-Schwefelsäure verursacht einige Schwierigkeiten; WIDMARK benutzt dazu eine besondere Glasspritze, HEIDUSCHKA und FLOTOW<sup>2</sup>, sowie KAISER und WETZEL<sup>3</sup> empfehlen statt dessen eine Kapillarbürette mit feinsten Ausflußmündung (Auslaufzeit von 2 ccm etwa 3 Minuten). Auch nach unseren Er-

fahrungen läßt sich auf diese Weise die Bichromat-Schwefelsäure sehr genau und gleichmäßig abmessen, wie die zur Kontrolle ausgeführten Wägungen ergaben. Das Füllen dieser Kapillarbürette geschieht durch Aufsaugen mittels eines Gummischlauches. Die anzuwendende Blutmenge bestimmt WIDMARK durch Entleerung und Zurückwägung des Kapillarröhrchens, in welchem das Blut aufgefangen wurde, mittels einer Torsionswaage. Die oben erwähnten Analytiker messen das Blut in Kapillarpipetten ab, was ebenfalls sehr genau und gleichmäßig geht.

Ausführung. Man bringt in 3 der, wie oben angegeben, gereinigten und getrockneten Kölbchen je 2 ccm der Bichromat-Schwefelsäure und in das an dem Glasstopfen befindliche Näpfchen je 0,2 ccm des fraglichen Blutes oder Blutserums. Gleichzeitig setzt man 3 weitere Kölbchen mit Bichromat-Schwefelsäure und 0,2 ccm Wasser, ohne Blut, an. Die gut verschlossenen Kölbchen (konz. Schwefelsäure zum Dichten zu verwenden, ist nicht ratsam) stellt man dann 2 Stunden lang in einen auf 50—60° angeheizten elektrischen Trockenschrank und titriert nach dieser Zeit den Bichromatüberschuß in folgender Weise zurück: Man öffnet die erkalteten Kölbchen vorsichtig (es darf natürlich keine Spur des eingetrockneten Blutes zur Bichromat-Schwefelsäure gelangen), verdünnt mit 25 ccm Wasser, läßt vollkommen erkalten, setzt 0,5 ccm

<sup>1</sup> E. M. P. WIDMARK: Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung. Fortschr. d. naturw. Forschung 1932, [N. F.] Heft 11.

<sup>2</sup> HEIDUSCHKA u. FLOTOW: Pharm. Zentralh. 1933, 74, 329.

<sup>3</sup> KAISER u. WETZEL: Zeitschr. angew. Chem. 1933, 46, 622.

Jodkaliumlösung hinzu und titriert 1 Minute später mit der 0,01 N.-Thiosulfatlösung aus einer in 0,05 ccm eingeteilten 10 ccm-Bürette das ausgeschiedene Jod zurück, indem man stets die gleiche Menge Stärkelösung (0,5 ccm) erst ganz gegen Ende der Titration zusetzt.

Da für die erste Titration meist längere Zeit gebraucht wird, so nimmt man für die Berechnung das Mittel von dem 2. und 3. Versuch.

Berechnung. Der Alkoholgehalt  $x$  in der angewandten Blutmenge, in mg ausgedrückt, berechnet sich aus der Differenz der verbrauchten ccm 0,01 N.-Thiosulfatlösung bei dem blinden Versuch  $a$  und bei der Blutprobe  $b$ , multipliziert mit dem Faktor 0,113, d. i.

$$x = (a - b) \cdot 0,113.$$

0,113 mg ist die von WIDMARK für 1 ccm 0,01 N.-Thiosulfatlösung durch den Versuch ermittelte Äthylalkoholmenge.

Den Blutalkohol drückt WIDMARK in mg in 1 g Blut aus, da er die Blutmenge abwägt. Wenn man das Blut abgemessen hat, wie oben angegeben, so gibt man den Alkoholgehalt in mg in 1 ccm an; bei dem Spez. Gewicht des Blutes von etwa 1,05 bedingt dieses keinen wesentlichen Unterschied.

Beispiel: Angewandt 0,183 ccm Blut, Leerversuch 9,38 ccm, Hauptversuch 5,15 ccm 0,01 N.-Thiosulfatlösung.  $x = (9,38 - 5,15) \cdot 0,113 = 0,478$  mg Alkohol in 0,183 ccm Blut, folglich in 1 ccm Blut = 2,61 mg = eine Konzentration von 2,61‰.

Der normale Alkoholgehalt des Blutes ist zu 0,03‰ geschätzt worden; nach den Angaben von WIDMARK deutet ein Alkoholgehalt von über 0,8‰ auf eine mögliche Alkoholwirkung hin, von über 1,6‰ (bei 80% der untersuchten Personen) auf eine deutliche und von über 2‰ auf eine sichere Alkoholbeeinflussung hin. Diese Grenzzahlen scheinen jedoch für deutsche Verhältnisse reichlich hoch gegriffen zu sein.

Weitere Literatur: E. M. P. WIDMARK: Blutproben für gerichts-medizinische Alkoholbestimmungen. *Biochem. Zeitschr.* 1930, **218**, 465. — R. M. MAYER: Zur Methodik der Alkoholbestimmung. *Deutsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.* 1932, **18**, H. 6. — J. KOLLER: Zur Technik der quantitativen Bestimmung des Alkohols im Blut nach der Methode von WIDMARK. *Deutsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.* 1932, **19**, H. 6. — R. GOLDHAHN: Blutalkoholbestimmung bei Unfällen. *Klin. Wochenschr.* 1932, Nr. 44. — Feststellung von Trunkenheit bei Unfällen mittels Blutalkoholbestimmung. *Deutsch. Zeitschr. Chir.* 1933, **239**, H. 5—6. — F. J. HOLZER: Zur Technik der Alkoholbestimmung im Blut. *Deutsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.* 1933, **20**, H. 4.

2. Interferometrisches Verfahren von KIONKA<sup>1</sup>. Was die Genauigkeit anbelangt, so ist die Bestimmung des Alkohols durch die Lichtbeugung mittels des Interferometers der durch die Lichtbrechung mittels des Refraktometers weit überlegen und dürfte wohl überhaupt das genaueste Verfahren sein.

Über die Einrichtung und den Gebrauch des Interferometers s. S. 293. Da der tatsächliche Nullpunkt mit dem Nullpunkt der Trommelablesung (Gleichheit der Interferenzstreifen) fast nie ganz übereinstimmt, so ist der Nullpunkt jedes Instrumentes ein für allemal festzustellen.

Zur bequemen Ablesung des Alkoholgehaltes fertigt man sich eine Tabelle in graphischer Darstellung auf Koordinatenpapier an, indem man die Trommelablesungswerte genau bekannter Alkoholkonzentrationen in der Abszisse und die entsprechenden Alkoholwerte in der Ordinate einträgt. Für die vorliegenden Zwecke der Blutalkoholbestimmung genügt es vollauf, wenn man die Tabelle in Intervallen von 0,20‰ zwischen 0 und 4‰ Alkohol ausführt.

KIONKA schreibt für die Eichung des Instrumentes zur Alkoholbestimmung die Verwendung absoluten, reinsten Alkohols vor; wir haben es als zweckmäßig empfunden, sich aus reinstem Alkohol zunächst eine etwa 20%ige wässrige

<sup>1</sup> KIONKA: *Pharmakologische Beiträge zur Alkoholfrage*, H. 1: Der Alkoholgehalt des menschlichen Blutes. Jena: Gustav Fischer.

Verdünnung herzustellen, deren Alkoholgehalt man pyknometrisch auf das Genaueste ermittelt. Aus dieser Mischung werden dann durch weitere Verdünnung die zur Eichung erforderlichen Konzentrationen hergestellt.

Während das WIDMARKSche Verfahren eine Mikromethode ist, bei der man etwa 0,2 ccm Blut anwendet, sind für die interferometrische Bestimmung nach KIONKA etwa 20 ccm Blut erforderlich.

Zunächst ist der Alkohol aus dem Blute durch Destillation abzutrennen. KIONKA benutzt zu diesem Zweck den nebenstehend abgebildeten Destillationsapparat (Abb. 10), dessen Anwendung ohne weiteres ersichtlich ist.

Der Destillationskolben A hat einen Fassungsraum von etwa  $\frac{1}{3}$ —1 l; die Destillation ist so schnell als möglich zu Ende zu führen und muß durch Regulation der Erwärmung des Kolbens in einem auf  $40^{\circ}$  angeheizten Wasserbade so geleitet werden, daß die Ventilkugeln in dem aufrecht stehenden Energiekühler nicht zu tanzen anfangen und die oberen Teile des Kühlers sich überhaupt nicht beschlagen. Das Vakuum soll mindestens 15 mm betragen; ist dies erreicht, dann setzt man das Wasserbad unter und destilliert, wie angegeben. Starkes Schäumen kann man durch Zudrehen des Quetschhahns b, oder indem man etwas Luft durch den Quetschhahn a hinzutreten läßt, verhindern. Die Destillation wird unterbrochen, wenn sich in der Vorlage etwa  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  des Volumens der zu destillierenden Flüssigkeit angesammelt hat. Die Vorlage ist durch Eiswasser gut zu kühlen.

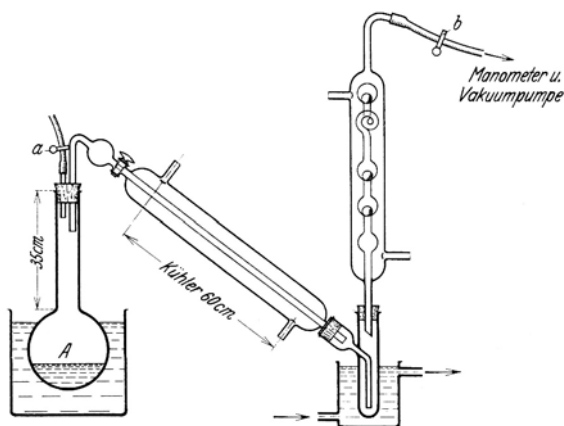


Abb. 10. Alkoholdestillationsapparat. (Nach KIONKA.)

Anspruch; länger darf sie keinesfalls dauern. Nach beendeter Destillation nimmt man die Vorlage ab, verdünnt den Inhalt auf 50 ccm, füllt einen Teil davon in die linke Kammer des Interferometers und stellt nach der Temperaturausgleichung an der Trommelablesung die Ablenkung bei einer Temperatur von etwa  $18^{\circ}$  im Vergleich zu destilliertem Wasser in der rechten Kammerhälfte fest. Das Einhalten der Temperatur spielt keine große Rolle, da es sich um eine Differenzbestimmung handelt.

Mit Hilfe der Eichungstabelle läßt sich aus den abgelesenen Trommelteilen der Alkoholgehalt des Destillates in % bzw.  $\text{‰}$  feststellen und aus der angewandten Blutmenge (20 ccm) der Alkoholgehalt des Blutes berechnen.

KIONKA hat die Beeinflussung der interferometrischen Messung durch andere Stoffe nachgeprüft und dabei gefunden, daß Milchsäure, Glycerin, Fettsäure und Kohlensäure bei der Methode nicht in Betracht kommen, daß aber Acetessigsäure oder Aceton einen Fehler bedingen würde; es ist deshalb erforderlich, zuvor die Destillate auf die Abwesenheit von Aceton zu prüfen, und zwar durch eine der empfindlichen Reaktionen nach GUNNING oder FROMMER und EMILEWICZ. Nach KIONKA finden sich andere, die Beugung des Lichtes beeinflussende Substanzen in den Blutdestillaten nicht vor, so daß die Trommelwertveränderungen nur auf einen Gehalt an Alkohol zurückzuführen sind.

### 3. Propylalkohol (n-Propylalkohol), $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$ .

(Eigenschaften S. 1014.)

Der n-Propylalkohol bietet in der forensen Chemie kein besonderes Interesse.

#### 4. Isopropylalkohol, Propanol (sec. Propylalkohol), $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix} > \text{CHOH}$ .

(Eigenschaften S. 1014 und Bd. I, S. 1055.)

Dieser Alkohol findet neuerdings an Stelle von Äthylalkohol in der Parfümerie vielfach Verwendung, da er billiger als der Äthylalkohol ist. Auch ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß er Trinkbranntweinen zugesetzt wird.

##### Nachweis.

α) Nitrobenzaldehydprobe (BODENDORF)<sup>1</sup>. Man unterschichtet einige Kubikzentimeter des Destillates, das vorher mit 0,2 g Kohlenpulver 1 Minute geschüttelt wurde, mit einer frisch bereiteten Lösung von m-Nitrobenzaldehyd in konz. Schwefelsäure (1 g Aldehyd auf 50 ccm Schwefelsäure) und stellt das Reagensglas eine Minute in heißes Wasser. Bei Gegenwart von Isopropylalkohol ist ein leuchtend roter Ring vorhanden.

β) Piperonalprobe nach R. REIF<sup>2</sup>. Von Branntweinen werden 10 ccm in einen kleinen Meßzylinder, der in Eiswasser steht, abdestilliert. Wenn nichts mehr übergeht, wird 1 ccm mit 2 ccm Wasser verdünnt. Davon werden 0,3 ccm mit 2 ccm Wasser vermischt und 0,04 g Kohle zur Adsorption der ätherischen Öle zugesetzt, das Ganze durchgeschüttelt und durch ein kleines Filter von etwa 4,5 ccm Durchmesser filtriert, das Filtrat wird in einem 100 ccm Rundkolben aufgefangen. Man gibt alsdann dazu 5 ccm einer 0,5%igen alkoholischen Piperonallösung und sehr vorsichtig 20 ccm reine Schwefelsäure. Hierbei ist zu beachten, daß keine zu große Erwärmung auftritt. Das Gemisch wird gut durchgeschüttelt. 4—5 ccm dieses Gemisches werden in einem Bechergläschen von etwa 50 ccm Inhalt und 3—4 cm Durchmesser 4—5 Minuten auf einem siedenden Wasserbad erwärmt. Bildet sich alsdann nur eine grünbraune bis braune Färbung, so ist Isopropylalkohol nicht zugegen, wenn jedoch eine rotbraune bis rote Färbung auftritt, so ist Isopropylalkohol vorhanden. Fügt man zu dem Inhalt des Bechergläschens sofort nach dem Erwärmen 30 ccm einer 30%igen Essigsäure, so bildet sich eine rosa bis rote Färbung, die längere Zeit bestehen bleibt. Entsteht keine oder nur eine schwache rote Färbung, die bald verschwindet, so ist kein Isopropylalkohol vorhanden.

Bei Destillaten aus Leichenteilen sind nur geringe Mengen des Destillates zu verwenden, die zweckmäßig genau wie oben behandelt werden.

#### 5. Isoamylalkohol (Amylalkohol), $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix} > \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \text{OH}$ .

(Eigenschaften S. 1020 und Bd. I, S. 1056.)

Die Amylalkohol enthaltenden Destillate sind trübe. Durch Ausschüttelung mit Äther oder Chloroform kann man den Amylalkohol dem Destillat entziehen. Nach Verdunsten des Extraktionsmittels bleibt er als ölige Tröpfchen zurück, die den charakteristischen Geruch besitzen.

Zum Nachweise dienen folgende Reaktionen:

1. MARQUARDTSche Reaktion: Die öligen Tröpfchen des Verdunstungsrückstandes werden mit wenig Wasser angeschüttelt und Kaliumpermanganat solange zugesetzt, bis die Rotfärbung bestehen bleibt. Nach 24stündigem Stehen im verschlossenen Reagensglas tritt beim Öffnen ein Geruch nach Baldrianester und zuletzt nach Baldriansäure auf.

2. UFFELMANNsche Probe: Zu den öligen Tröpfchen setzt man in einem weißen Porzellanschälchen eine frisch bereitete Lösung von Methylviolett in

<sup>1</sup> BODENDORF: Z. 1930, 59, 616.

<sup>2</sup> R. REIF: Z. 1928, 55, 204.

Salzsäure, die eine grüne Färbung besitzt, zu. Die öligen Tropfen schwimmen auf der grün gefärbten Salzsäure und sind selbst violett gefärbt.

### 6. Tertiärer Amylalkohol (Amylenhydrat), $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} > \text{COH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3$ .

Er ist eine farblose Flüssigkeit, deren Geruch an Campher und Pfeffermünz erinnert. Das Amylenhydrat findet als Schlafmittel Verwendung. Siedepunkt = 102,5, Spez. Gewicht bei 15° 0,814.

Charakteristische Reaktionen zum Nachweis fehlen.

## V. Aldehyde.

Wichtig von den Aldehyden der aliphatischen Reihe sind der Formaldehyd und Acetaldehyd. Weniger wichtig und zu Vergiftungen wohl kaum geeignet sind die meisten aromatischen Aldehyde, wie Salicylaldehyd, Piperonal, Vanillin usw.

Über die allgemeinen Aldehydreaktionen mit NESSLERSchem Reagens, ammoniakalischer Silberlösung usw. s. S. 1023.

### 1. Formaldehyd (Ameisensäurealdehyd) $\text{H} \cdot \text{CHO}$ .

(Eigenschaften s. S. 1035 und Bd. I, S. 1019.)

#### a) Nachweis.

Der Formaldehyd ist ziemlich lange in Leichenteilen nachweisbar. Wegen seiner leichten Flüchtigkeit befindet er sich in den ersten Fraktionen des Destillates gelöst. Die Isolierung aus den Leichenteilen geschieht nach dem Destillationsverfahren. Bei Anwesenheit von Formaldehyd besitzen die ersten Destillate einen stechenden Geruch.

$\alpha$ ) Nachweis als Hexamethylentetramin s. S. 1037.

$\beta$ ) Morphin-Schwefelsäure-Reaktion<sup>1</sup>. 1—2 ccm der zu prüfenden Lösung werden mit 5 ccm konz. Schwefelsäure unter vorsichtiger Abkühlung versetzt. Nach dem Erkalten setzt man 2,5 ccm einer frisch bereiteten Lösung von 0,2 g Morphinhydrochlorid in 10 ccm konz. Schwefelsäure gelöst zu. Je nach der Menge vorhandenen Formalins tritt die Violettfärbung früher oder später ein; sie kann von hellem Violett ins dunkle Violett und zuletzt in eine Rotfärbung übergehen. Die Beobachtungsdauer kann bis zu 1 Stunde ausgedehnt werden.

An Stelle des Morphins wird auch Kodein angewendet. Es entsteht eine intensive Blaufärbung; die angewandte Schwefelsäure muß absolut eisenfrei sein. Acetaldehyd und Furfurol geben keine Blaufärbung. Schärfe des Nachweises 1:100000.

$\gamma$ ) Nachweis nach O. HEHNER. Einige Kubikzentimeter oder wenige Tropfen der Flüssigkeit bzw. des Destillates, je nach der zu vermutenden Menge an Formaldehyd, werden nach S. 1030 geprüft. Größere Mengen Acetaldehyd, Alkohol und ätherische Öle stören diese Reaktion. Die Probe kann auch als Schichtreaktion angewendet werden. Einige Kubikzentimeter der zu prüfenden wäßrigen Lösung mit der gleichen Menge Milch, die mit einigen Tropfen verd. Eisenchloridlösung versetzt ist, gemischt und mit konz. Schwefelsäure überschichtet, bildet an der Berührungszone eine violette Schicht, die Reaktion verstärkt sich nach einigen Stunden. Nach E. SALKOWSKI<sup>2</sup> kann man an Stelle

<sup>1</sup> A. JÖRISSEN: Rev. intern. Falsific. 1898 11, 12. — G. FENDLER u. C. MANNICH: Arb. a. d. Pharm. Inst. der Univ. Berlin 1906, 3, 243.

<sup>2</sup> E. SALKOWSKI: Biochem. Zeitschr. 1914, 68, 337.

von Milch auch Albumosen nehmen, besonders ist Pepton zu empfehlen. Die Lösung wird intensiv violett gefärbt.

δ) Probe nach G. DENIGÈS<sup>1</sup>. Diese Methode ist deshalb sehr brauchbar, da sie selbst bei Gegenwart von viel Acetaldehyd eine eindeutige Reaktion gibt; selbst in stark schwefelsaurer Lösung wirkt der Acetaldehyd nicht störend. Folgende abgeänderte Methode gibt sehr gute Resultate. Bei Methylalkohol muß zuvor die Oxydation nach DENIGÈS (S. 1301) durchgeführt werden. Man setzt 3 ccm SCHIFF-ELVOVESCHES<sup>2</sup> Reagens der zu prüfenden Flüssigkeit zu. Nach einiger Zeit tritt eine Blau- oder Violettfärbung ein, die nach 1 Stunde noch vorhanden ist. Das Reagens wird in der Weise hergestellt, daß man 0,2 g gepulvertes Fuchsin in 120 ccm heißem Wasser löst, nach dem Erkalten 2 g wasserfreies Natriumsulfit, das in 20 ccm Wasser gelöst war, zufügt und nach Zusatz von 2 ccm konz. Salzsäure auf 200 ccm auffüllt.

Nachweis mit mehrwertigen Phenolen in saurer oder alkoholischer Lösung.

ε) Resorcin-Probenach LEBBIN. Gleiche Volumen einer 5%igen wäßrigen Resorcinlösung und eine 40%ige Ätznatronlösung werden gemischt. Dieser Mischung setzt man etwa die gleiche Menge des Destillates zu, das gegebenenfalls vorher noch verdünnt wurde. Man hält das Gemisch 1 Minute lang im Sieden. Eine Rotfärbung zeigt Formaldehyd an. Störend wirken etwa vorhandene Eiweißstoffe, die durch Destillation abgetrennt werden können. Chloroform und Chlorat können die Anwesenheit von Formaldehyd vortäuschen.

ζ) Phloroglucin-Probe nach COUNCLER<sup>3</sup>. Wird die zu prüfende Flüssigkeit mit einem Gemisch gleicher Raumteile 38%iger Salzsäure und Wasser unter Zugabe von sehr wenig Phloroglucin zum Sieden erhitzt, so tritt nach Auflösung des Phloroglucins eine Trübung unter Abscheidung gelbroter Flocken ein. Alle CH<sub>2</sub>-Gruppen enthaltenden Körper geben ähnliche Reaktionen.

η) Guajacol-Probe nach B. PFYL, G. REIF und A. HANNER<sup>4</sup>. Auf eine weiße Unterlage gibt man in ein Uhrglas 0,5 ccm einer gut gekühlten Lösung von 0,02 Guajacol in 10 ccm reiner konz. Schwefelsäure und tropft in die Mitte dieser Lösung etwa 0,1 ccm der gut gekühlten farblosen Flüssigkeit. Wenn es sich um Methylalkohol handelt, setzt man das farblose, ebenfalls gut gekühlte Oxydationsgemisch, das auf Formaldehyd geprüft werden soll, zu. Eine rote Färbung zeigt Formaldehyd an. An Stelle von Guajacol kann man auch Apomorphin nehmen, wobei eine dunkelgraue, violette Färbung entsteht. Den Nachweis kann man durch Bildung von Niederschlägen wesentlich verfeinern. Man verfährt wie ausgeführt und fügt nach 1 Stunde mit einer Pipette 0,5 ccm Wasser tropfenweise in die Mitte der auf dem Uhrglas befindlichen Flüssigkeit zu und läßt ohne Umrühren das Uhrglas ruhig stehen. Nach etwa 12 Stunden hat sich alsdann ein deutlich sichtbarer krystalliner Niederschlag gebildet in Form eines Kranzes. B. OLSZEWSKI<sup>5</sup> hält diesen Nachweis für den besten.

θ) Phenylhydrazin-Probe nach SCHRYVER. Die auf Formaldehyd zu prüfende Lösung, etwa 10 ccm, versetzt man mit 2 ccm einer 1%igen frisch bereiteten Lösung von Phenylhydrazin und 1 ccm einer frisch bereiteten 1%igen Kaliumferricyanidlösung und 5 ccm konz. Salzsäure. Bei Gegenwart von Formaldehyd wird die Lösung fuchsinrot. Acetaldehyd und Furfurol reagieren nicht.

<sup>1</sup> G. DENIGÈS: Compt. rend. Paris 1910, 150, 529.

<sup>2</sup> Journ. Ind. and Engin. Chem. 1917, 9, 295; C. 1920, IV, 269.

<sup>3</sup> COUNCLER: Chem.-Ztg. 1896, 20, 585.

<sup>4</sup> B. PFYL, G. REIF u. A. HANNER: Z. 1921, 42, 223.

<sup>5</sup> B. OLSZEWSKI: Roczniki Farmacji 1925, 3, 77; C. 1926, II, 801.

Bei Kondensationsprodukten des Formaldehyds ist das Kondensationsprodukt erst durch Erwärmen mit der salzsauren Phenylhydrazinlösung zu zerlegen, alsdann wird die Kaliumferricyanidlösung zugesetzt.

### b) Bestimmung.

Größere Mengen Formaldehyd werden zweckmäßig durch Titration bestimmt, kleinere Mengen lassen sich sehr gut colorimetrisch bestimmen. Diese letztere Methode ist auch für Methylalkohol, der vorher zu Formaldehyd oxydiert worden ist, gut anwendbar, weshalb die colorimetrische Methode namentlich auch zur Bestimmung von Methylalkohol in Leichteilen Anwendung findet.

α) Jodometrische Methode nach G. ROMJN s. S. 1041.

#### Colorimetrische Methoden.

Die colorimetrischen Methoden sind auch für Methylalkohol anwendbar, wenn er vorher zu Formaldehyd oxydiert worden ist. Methoden der Oxydation s. unter Methylalkohol, S. 1301.

β) Bestimmung mit Fuchsinbisulfit<sup>1</sup>. Über die Ausführung der Farb-reaktion mit dem SCHIFF-ELVOVESCHEN Reagens s. auch unter Nachweis von Formaldehyd nach DENIGÉS, S. 1309.

Für die Vergleichszwecke stellt man sich eine 0,1%ige Formaldehydlösung, bzw., wenn es sich um Methylalkohol handelt, eine 1%ige Methylalkohollösung her, die nach den Vorschriften beim Nachweis von Methylalkohol unter ε (S. 1301) oxydiert wird. Da sich schwache Farbtöne am besten vergleichen lassen, so stellt man durch einen Vorversuch die ungefähre Stärke der Färbung fest. Falls diese zu stark ist, so muß mit stärkerer Verdünnung gearbeitet werden. — Die Vergleichsversuche setzt man mit entsprechenden bestimmten Mengen obiger Formaldehyd- oder vorher oxydierter Methylalkohollösung an, so daß man eine in der Intensität der Farbtonung vom schwächsten Blau ansteigende Reihe erhält, z. B. mit 0,3, 0,5, 1,0, 1,5 und 2 ccm.

Bei Methylalkohol wird die Oxydation unter Zusatz von 0,5 ccm Äthylalkohol durchgeführt und auf jeweils 5 ccm mit Wasser aufgefüllt. Die Einhaltung dieser Oxydationsvorschrift ist notwendig, da der Methylalkohol nur zu etwa  $\frac{1}{18}$  zu Formaldehyd oxydiert wird; mithin sind die einzelnen Vergleichsmengen, also 0,3, 0,5, 1,0, 1,5 und 2 ccm, getrennt für sich zu oxydieren.

Die Reaktion und Farbintensitätsbeobachtung wird zweckmäßig in Schüttelzylindern mit Glasstopfen von etwa 25 ccm Inhalt vorgenommen. Sämtliche Versuche müssen zur selben Zeit angesetzt werden, da die Intensität der Färbung mit der Zeit zunimmt.

Die Beobachtung geschieht nach 20 Minuten bei auffallendem und durchfallendem Licht auf weißer Unterlage. Ohne Schwierigkeiten gelingt es, den Farbton herauszusuchen, der der fraglichen Lösung am nächsten steht; liegt der Farbton z. B. zwischen 0,3 und 0,5 ccm, so kann man zwischen diesen Werten liegende weitere Verdünnungen, wie eben beschrieben, herstellen und mit der fraglichen, neu mit Reagens versetzten Lösung vergleichen. Sollte der Vergleich mit dem bloßen Auge nicht genau genug erscheinen, so kann man sich noch eines Kolorimeters bedienen.

Bei genauem Arbeiten kann man bei niederem Formaldehyd- bzw. Methylalkoholgehalt gute Werte erlangen, bei Lösungen von 3—5% eine Genauigkeit erreichen, deren Fehlergrenze etwa 0,2% beträgt.

<sup>1</sup> TH. V. FELLEBERG: Biochem. Zeitschr. 1918, 85, 45—117.

Bestimmung nach AUTENRIETH<sup>1</sup>.

Zu dieser Bestimmung wird eine alkalische Phloroglucinlösung verwendet. Bei Gegenwart von Formaldehyd tritt eine mehr oder weniger starke Gelbfärbung auf. Zum Vergleich dient eine haltbare Lösung, die dem Keilcolorimeter von AUTENRIETH und KÖNIGSBERGER, in dem die colorimetrische Bestimmung vorgenommen wird, beigegeben ist (Bezugsquelle Fr. Hellige & Co., Freiburg, Baden).

Kondensationsprodukte des Formaldehyds werden arzneilich verwendet. Aus verschiedenen dieser Körper kann Formaldehyd abgespalten und nachgewiesen werden.

2. Acetaldehyd,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CHO}$ .

(Eigenschaften und Nachweis s. S. 1045.)

## VI. Ketone.

1. Aceton, Dimethylketon,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ .

(Eigenschaften und Nachweis s. S. 1058.)

Aceton als solches ist wohl kaum giftig. Bei Zuckerkranken findet man häufiger in Leichenteilen Aceton.

2. Acetophenon (Hypnon),  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ .

Acetophenon ist eine aromatisch riechende Flüssigkeit, die nur wenig in Wasser löslich ist. Siedepunkt  $202^\circ$ .

Reaktionen. Acetophenon gibt die Jodoformreaktion und die LEGALSche Probe (S. 1058). Bei Anwesenheit von Acetophenon entsteht eine tiefrote Färbung, die durch überschüssige Essigsäure in Violett umschlägt.

## VII. Äther.

Äther (Diaethyläther)  $\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_5$ , ist eine farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit von typischem Geruch und löst sich in 10 Teilen Wasser. Siedepunkt =  $34,9^\circ$ ; Spez. Gewicht ( $15^\circ$ ) = 0,72.

Nachweis. Infolge seiner großen Flüchtigkeit und mangels typischer Reaktionen ist der Äther in Leichenteilen meist nicht nachweisbar. Ist genügend Material vorhanden, so können die physikalischen Konstanten zur Identifizierung dienen.

## VIII. Phenole.

Die einwertigen Phenole und ihre Ester sind mit Wasserdämpfen, ebenso wie die Naphthole, flüchtig. Die zweiwertigen Phenole sind mit Wasserdämpfen nicht flüchtig und können erst im späteren Gang durch Extraktion aufgefunden werden. Die mit Wasserdämpfen flüchtigen Phenole weisen einen mehr oder weniger typischen Geruch auf.

## Allgemeine Reaktionen.

1. Mit Eisenchloridlösung. Die Destillate geben mit verd. Eisenchloridlösung starke Färbungen, die blau, violett, grün oder rot sein können. Hierdurch schon kann man die Phenole unter sich unterscheiden. Durch andere organische Verbindungen, die eine Hydroxylgruppe besitzen, können Phenole vorgetäuscht werden, auch kann die Reaktion bei Gegenwart gewisser Stoffe ausbleiben. Vor allem müssen freie Säuren oder Alkalien neutralisiert werden, bevor die Reaktion auf Phenole angestellt wird.

<sup>1</sup> AUTENRIETH: Münch. med. Wochenschr. 1921.



2. Mit MILLONS Reagens. Läßt man die Destillate mit gleichen Teilen Reagens gemischt längere Zeit stehen oder erwärmt schwach, so tritt bei Anwesenheit von Phenolen eine hell- bis dunkelrote Färbung auf.

3. EYKMANNSche Probe. Setzt man dem Destillat einige Tropfen Spiritus aetheris nitrosi zu und unterschichtet mit konz. Schwefelsäure, so tritt eine rote Zone an der Berührungsstelle auf.

4. Bromwasser gibt mit phenolhaltigen Flüssigkeiten Trübungen bzw. Fällungen.

5. Azoreaktion. Man fügt zu einigen cem 1% salzsaure Anilinlösung, kühlt auf etwa 0° ab, setzt einige Tropfen Nitritlösung (5%) zu, macht mit Natronlauge alkalisch und fügt schnell die Phenollösung zu.

### 1. Phenol (Benzophenol, Karbolsäure), $C_6H_5 \cdot OH$ .

Das Phenol bildet farblose, lange, stark typisch riechende Krystallnadeln, die in wäßriger Lösung schwach saure Reaktion zeigen. Mit wenig Wasser versetzt, entsteht eine spez. schwere Flüssigkeit, die flüssige Carbolsäure. Es findet sich zu etwa 1% im Steinkohlenteer.

Mit Wasserdämpfen ist Phenol leicht flüchtig. Bei Anwesenheit größerer Mengen trübt sich das Destillat milchig. Bei Fäulnis bilden sich aus den Eiweißstoffen geringe Mengen von Phenol. Das Phenol wird im Organismus an Schwefelsäure zu Phenolschwefelsäure gebunden. Sind größere Mengen von Phenol vorhanden, so bildet sich Phenol-Glucuronsäure. Ein Teil des Phenols wird auch in Dioxybenzole, Hydrochinon bzw. Brenzkatechin, übergeführt.

Schmelzpunkt = 42—43°; Siedepunkt 178—182°; Spez. Gew. (15°) = 1,066.

#### a) Nachweis.

Um in Leichenteilen Phenol nachzuweisen, unterwirft man sie aus schwach weinsaurer Lösung einer langsamen, aber länger durchgeführten Wasserdampfdestillation. Gibt das Destillat auf Zusatz von Bromwasser keine Trübung mehr, so ist alles Phenol, das als freies Phenol vorhanden war, übergetrieben.

Dasjenige Phenol, das an Schwefelsäure gebunden ist, kann man durch Zusatz von verd. Schwefelsäure in Freiheit setzen und dann überdestillieren. Die Schwefelsäuremenge muß so reichlich bemessen sein, daß eine 2%ige Lösung entsteht. Alsdann werden die Leichenteile erneut einer Destillation unterworfen. Dieses Destillat ist meist stark verunreinigt. Am besten schüttelt man die Phenole mit Äther aus und läßt diesen verdunsten. Von weiteren Verunreinigungen kann das Phenol dadurch gereinigt werden, daß man den Verdunstungsrückstand in Wasser löst und filtriert.

Zum Nachweise des Phenols dienen folgende Reaktionen:

α) MILLONSche Reaktion. Beim Erwärmen des Destillates mit gleichen Teilen MILLONS-Reagens tritt bei Gegenwart von Phenolen eine schöne Rotfärbung auf. Diese Reaktion ist jedoch für Phenol nicht typisch, da Kresole, Salicylsäure und auch Eiweißstoffe die gleiche Reaktion geben. Schärfe der Reaktion: 1:20000.

β) Bromwasser-Reaktion nach LANDOLT. Einige Kubikzentimeter des Destillates geben, wenn Phenol vorhanden ist, mit überschüssigem Bromwasser eine Trübung unter Bildung von schönen Kryställchen von Tribromphenolbrom,  $C_6H_2Br_3OBr$ , Schmelzpunkt 131—133°. Die Trübung als solche ist nicht charakteristisch, da auch andere, Hydroxylgruppen enthaltende Körper, wie Salicylsäure u. a. m., Trübungen geben. Der Schmelzpunkt der Bromverbindung gibt jedoch eindeutigen Aufschluß. Schärfe der Reaktion: 1:40000.

γ) Eisenchlorid-Reaktion. Das mit wenigen Tropfen verd. Eisenchloridlösung versetzte Destillat gibt bei Anwesenheit von Phenol eine blaue bis

blauviolette Färbung, die auf Zusatz von Salzsäure in Gelb übergeht und durch Alkoholzusatz verschwindet. Die Reaktion ist nicht eindeutig. Schärfe der Reaktion: 1:1000.

δ) LEXSche Probe. Das Destillat wird zu  $\frac{1}{4}$  Volumen mit Ammoniak und einigen Tropfen einer Chlorkalklösung (1:20) versetzt und erwärmt. Bei Anwesenheit von Phenolen entsteht Blaufärbung. Ist die Phenollösung sehr verdünnt, so tritt nach längerer Zeit eine Grünblaufärbung ein. Auch diese Reaktion ist nicht eindeutig.

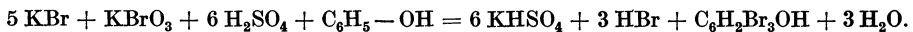
ε) MELZERSche Probe. Fügt man zu 1 ccm des Destillates 2 ccm konz. Schwefelsäure und 2 Tropfen Benzaldehyd und kocht einmal auf, so färbt sich die Flüssigkeit dunkelrot. Bei konz. Lösungen scheiden sich rote Harze ab. Verdünnt man die Lösung mit etwa 10 ccm Wasser und macht mit Kalilauge alkalisch, so tritt eine Tiefviolettrotfärbung auf. o-Kresol gibt die gleiche Reaktion. Schärfe der Reaktion 1:2000.

ζ) Pikrinsäure-Reaktion. Erwärmt man das Destillat einige Zeit am Rückflußkühler mit konz. Salpetersäure, so bildet sich bei Gegenwart von Phenol Pikrinsäure. Nach dem Verdünnen des Reaktionsproduktes mit Wasser kann die gebildete Pikrinsäure durch Äther ausgeschüttelt werden. Der Verdunstungsrückstand zeigt die Eigenschaften der Pikrinsäure (s. S. 1367). Schmelzpunkt = 122,5°.

#### b) Bestimmung nach BECKURTS<sup>1</sup>.

Die Methode beruht auf der Ausscheidung des Phenols als Tribromphenol. Um eine Lösung zu haben, die stets die gleiche Menge Brom zur Ausfällung des Phenols enthält, stellt man sich aus Kaliumbromid und Kaliumbromat zwei getrennte Lösungen von bestimmtem Gehalt her, die auf Zusatz von überschüssiger Säure stets eine bestimmte Menge Brom liefern, wie die nachstehende Gleichung zeigt.

Bei Gegenwart von Phenol wirkt das freie Brom auf das Phenol unter Bildung von Tribromphenolbrom und Tribromphenol ein. Es muß dabei Brom im Überschuß vorhanden sein. Gibt man nun zu der Lösung Kaliumjodid, so wird von dem überschüssigen Brom die äquivalente Menge Jod in Freiheit gesetzt, und ferner wird das eine labile Bromatom des Tribromphenolbroms gebunden, so daß jetzt alles Phenol als Tribromphenol sich ausscheidet. Die Reaktionsgleichung ist letzten Endes folgende:



Demnach kommen auf 1 Mol Phenol 6 Atome Brom, von denen 3 Atome an Phenol und 3 als Bromwasserstoff an Wasserstoff gebunden sind.

Das überschüssige Brom wird mit Kaliumjodid umgesetzt, wobei die äquivalente Menge Jod frei wird, die man mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurückmessen kann. Man stellt dadurch fest, wieviel Brom nicht an Phenol gebunden ist, und kann die gebundene Menge Brom und damit die Phenolmenge daraus berechnen.

Es werden in einen Kolben mit Glasstöpsel 50 ccm einer Kaliumbromidlösung, die im Liter  $5 \times 1,1902 = 5,951$  g Kaliumbromid enthält, und 50 ccm einer Kaliumbromatlösung, die im Liter 1,6702 g Kaliumbromat enthält, und die zu untersuchende abgemessene Phenolmenge, 10—50 ccm, gebracht. Alsdann fügt man 5 ccm konz. Schwefelsäure hinzu und schüttelt einige Minuten mit aufgesetztem Glasstöpsel durch. Es scheidet sich die Phenolbromverbindung in feinen weißen Kryställchen ab. Die Lösung selbst muß noch gelblichbraun gefärbt sein; es muß also Brom sich im Überschuß befinden. Nach Verlauf von 15 Minuten setzt man reines Kaliumjodid zu und titriert das ausgeschiedene Jod unter Zusatz von Stärkelösung als Indicator mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurück.

<sup>1</sup> BECKURTS: Arch. Pharm. 1886, 224, 56, 572.

Die Berechnung des Phenols ist folgende: 100 ccm der Kaliumbromid- und der bromatlösung liefern  $\frac{6}{2000}$  Atome Brom = 0,23976 g Brom. Nach der Gleichung

$$\begin{array}{l} \frac{6}{100} \text{ Atome Brom} : \frac{1}{100} \text{ Mol Phenol} \\ 4,7952 \quad \quad \quad : \quad 0,9405 \quad \quad = 0,23976 : x, \end{array}$$

zeigen diese 0,23976 g Brom = 0,04703 Phenol an. Nun fügte man zur Bindung des unverbrauchten Broms Kaliumjodid hinzu, wodurch die dem Brome äquivalente Menge Jod in Freiheit gesetzt wird, welches mittels 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung zurückgemessen wird. Da nun 0,1 Atom Jod = 0,1 Atom Brom = 1000 ccm 0,1 N.-Natriumthiosulfat äquivalent ist, so zeigen  $\frac{6}{10}$  Atome Jod = 0,1 Mol Phenol oder 1 ccm 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung = 0,001567 g Phenol an. Die verbrauchten Kubikzentimeter Natriumthiosulfatlösung werden mit 0,001567 g multipliziert und der gefundene Wert von 0,04703 abgezogen. Der verbleibende Rest zeigt alsdann die Menge Phenol an, die sich in der abgemessenen Phenollösung befindet.

### Phenolbestimmung im Harn.

Da bei Phenolvergiftungen das Phenol in größerer Menge als Phenol-Schwefelsäure vorhanden ist, so ist auch seine Bestimmung im Harn von Wichtigkeit. Geringe Mengen Phenol werden normalerweise täglich ausgeschieden, allerdings zum größten Teil in Form von p-Kresol. Die Menge beträgt innerhalb 24 Stunden 0,03 g.

In normalen Harnen finden sich schwefelsaure Salze in nicht unerheblichen Mengen. Diese sog. Sulfat-Schwefelsäure unterscheidet sich von der präformierten Schwefelsäure, der an Phenole gebundenen, dadurch, daß letztere keine  $\text{SO}_4$ -Ionen besitzt und mithin auch durch Bariumchlorid nicht aus der wäßrigen Lösung ausgefällt werden kann. Kocht man aber die präformierte Schwefelsäure mit Salzsäure, so wird sie zerlegt und kann alsdann durch Bariumchlorid als Bariumsulfat gefällt werden. Da in Phenolharnen sich sehr viel präformierte Schwefelsäure vorfindet, deren Menge erheblich größer ist als die der Sulfatschwefelsäure, so ist die Bestimmung beider Schwefelsäuren von Wichtigkeit.

α) Phenolbestimmung im Harn nach MOOSER<sup>1</sup>. Eine gemessene Menge Harn, 250—500 ccm, wird mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und bis zur Hälfte auf dem Wasserbade eingedampft. Durch Zusatz von Wasser wird das ursprüngliche Volum wieder hergestellt und der Harn in einen Destillierkolben gebracht, der des Schäumens wegen nur zu etwa  $\frac{1}{3}$  angefüllt sein darf. Aus einem Scheidetrichter läßt man sirupöse Phosphorsäure allmählich zufließen. Unter guter Kühlung wird abdestilliert und die Destillation solange fortgesetzt, bis noch etwa 100 ccm Rückstand im Destillationskolben sich befinden. Alsdann läßt man durch den Scheidetrichter 100 ccm Wasser zufließen und destilliert erneut. Diese Manipulation ist so lange zu wiederholen, bis 5 ccm Destillat mit MILLONSCHEM Reagens keine Rotfärbung mehr geben. Das Destillat wird mit Kaliumcarbonat alkalisiert bzw. neutralisiert und unter Durchleiten von Kohlensäure, wie bei der ersten Destillation, erneut destilliert.

Die Bestimmung kann nach KOSSLER und PENNY<sup>2</sup> in der Weise ausgeführt werden, daß ein aliquoter Teil des Destillates mit 0,1 N.-Alkalilauge stark alkalisch gemacht, auf 60° erwärmt und gemessene überschüssige Jodlösung zugesetzt wird. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert und das überschüssige Jod mit 0,1 N.-Natriumthiosulfatlösung unter Zusatz von Stärkelösung zurückgemessen. 6 Mol Jod zeigen, da sich Trijodphenol,  $\text{C}_6\text{H}_2\text{J}_3\text{OH}$ , und 3 Mol Jodwasserstoff bilden, 1 Mol Phenol an. 1 ccm verbrauchter 0,1 N.-Jodlösung ist daher = 0,001567 g Phenol, s. oben.

<sup>1</sup> MOOSER: Zeitschr. physiol. Chem. 1909, 63, 153.

<sup>2</sup> KOSSLER u. PENNY: Zeitschr. physiol. Chem. 1893, 17, 117.

$\beta$ ) Bestimmung der Sulfat- und präformierten Schwefelsäure im Harn. Eine gemessene Menge, etwa 50 ccm, Harn wird mit der gleichen Menge Wasser, 5 ccm verd. Essigsäure und überschüssiger Bariumchloridlösung versetzt und erwärmt. Die Erwärmung wird solange fortgesetzt, bis sich der Niederschlag völlig abgesetzt hat; er wird aldsann abfiltriert und zuerst mit Wasser, dann mit kalter, verd. Salzsäure und zuletzt nochmals mit Wasser ausgewaschen. Das zur Wägung gebrachte Bariumsulfat ist die Sulfat-Schwefelsäure.

Das Filtrat und die Waschwässer werden gesammelt und mit verd. Salzsäure erwärmt. Hierdurch wird die präformierte Schwefelsäure gespalten. Nach dem klaren Absetzen wird das ausgeschiedene Bariumsulfat gesammelt, mit Wasser und zuletzt mit heißem Alkohol, um die mitgerissenen harzigen Produkte zu entfernen, ausgewaschen. Dieses zur Wägung gebrachte Bariumsulfat entspricht der präformierten Schwefelsäure, deren Wert bei Phenolvergiftungen höher ist, als der Wert der Sulfat-Schwefelsäure.

#### Nachweis von Phenol in Hutschweißleder nach FROBOESE<sup>1</sup>.

200 qcm fein zerschnittenen Leders werden mit 75 ccm 10%iger Natronlauge 2 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Die Flüssigkeit wird abfiltriert und nachgewaschen. Unter Eiskühlung wird Kohlensäure bis zur Sättigung eingeleitet, das Phenol mit Äther ausgeschüttelt und letzterer vorsichtig bei gelinder Wärme abdestilliert. Die letzten Reste des Äthers entfernt man durch Durchleiten von Luft. Der verbleibende Rückstand wird mit 40 ccm Wasser aufgenommen und von dem Ungelösten, Harzstoffen usw. abfiltriert. In dieser wäßrigen Lösung kann man nun das Phenol nachweisen.

## 2. Kresole und Lysol, Methylphenole, $C_6H_4 \cdot CH_3(OH)$ .

Das o-, m- und p-Kresol sind die Hauptbestandteile des Rohkresols. Die Kresole sind in Wasser schwer löslich. Um sie für technische Zwecke, Desinfektion usw. brauchbar zu machen, führt man sie entweder durch Zusatz von Alkali und Kaliseifen, oder durch Zusatz von Salzen aromatischer Säuren in lösliche Form über.

### Nachweis.

Bei der Prüfung auf Kresole, einschließlich Lysol, genügt der Nachweis der Kresole selbst.

Die zerkleinerten Leichteile werden, nachdem sie mit Wasser versetzt und mit Weinsäure oder verd. Schwefelsäure stark angesäuert sind, der Wasserdampfdestillation unterworfen. Es gehen dabei außer den Kresolen auch Kohlenwasserstoffe anderer Art mit über. Das Destillat wird ausgeäthert. Die ätherische Lösung läßt man bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten. Um Reste von anderen Kohlenwasserstoffen, die mit überdestilliert sind, zu entfernen, nimmt man den Rückstand mit verd. Natronlauge auf und schüttelt die wäßrige Lösung mit Petroläther aus, der diese Kohlenwasserstoffe in Lösung überführt. Die wäßrig-alkalische Lösung wird nun mit Salzsäure angesäuert, und die frei gewordenen Kresole werden mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers bleiben die Kresole zurück.

Den Rückstand schüttelt man mit Wasser an und benutzt die filtrierte Lösung zum Nachweis der Kresole.

o-Kresol bildet stark riechende Krystalle, die in Wasser löslich sind. Schmelzpunkt = 31—31,5°, Siedepunkt = 185—186°.

m-Kresol ist eine stark riechende Flüssigkeit, die in Wasser schwer löslich ist. Siedepunkt = 201°.

<sup>1</sup> FROBOESE: Z. 1921, 42, 113.

p-Kresol bildet durchdringend riechende Krystalle, die in Wasser löslich sind. Schmelzpunkt = 35—36°; Siedepunkt = 198—199°.

#### Reaktionen der drei Kresole.

1. LEXSche Probe. Siehe Phenol S. 1313. Dieselbe gibt nur mit o- und m-Kresol eine Reaktion. p-Kresol gibt nur eine schmutzig-grüne Färbung.

2. MELZERSche Probe. Nur o-Kresol gibt die Reaktion, s. Phenol.

Es ist wichtig, auch den Harn auf Anwesenheit von Kresolen zu prüfen und wie bei Phenol das Verhältnis der Sulfat- und präformierten Schwefelsäure zu bestimmen, s. unter Phenol, S. 1314.

### 3. Kreosot und Guajacol.

Der Buchenholzteer enthält als Hauptbestandteile das Guajacol,  $C_6H_4 \begin{smallmatrix} OCH_3 \\ OH \end{smallmatrix}$ , und das Kreosol,  $C_6H_3(CH_3) \begin{smallmatrix} OCH_3 \\ OH \end{smallmatrix}$ . Das Kreosot ist, ebenso wie Guajacol und Kreosol, flüssig. Ganz rein bildet Guajacol eine rhomboedrische Krystallmasse. Mit Wasserdämpfen können diese Phenolabkömmlinge übergetrieben werden. Es sind farblose, stark lichtbrechende und typisch riechende Körper, die in Wasser schwer löslich sind. Guajacol: Schmelzpunkt = 33°; Siedepunkt = 205°; Spez. Gewicht: (15°) = 1,143. Kreosol: Siedepunkt = 221°. Kreosot Siedepunkt = 205—210°. Spez. Gewicht (15°) = 1,08.

An Reaktionen sind zu nennen: MILLONS Reagens ruft Rotfärbung hervor; die EJKMANSsche Probe erzeugt Kirschrotfärbung; mit Eisenchloridlösung entstehen Blaugrünfärbungen.

### 4. Thymol (Methylisopropylphenol), $C_6H_3 \cdot \overset{(1)}{CH_3} \cdot \overset{(4)}{C_3H_7} \cdot \overset{(3)}{OH}$ .

Thymol ist ein Hauptbestandteil verschiedener ätherischer Öle. Es bildet feste Krystalle von typischem aromatischem Geruch, die in Wasser schwer löslich sind; sie schmelzen bei 50—51° und sieden bei 230°; Spez. Gewicht (15°) = 1,028.

Mit MILLONS und EJKMANS Reagens tritt Rotfärbung ein. Konz. Schwefelsäure verändert Thymol in der Kälte nicht; beim Erwärmen tritt eine rosarote Färbung auf.

### 5. Carvacrol (Oxycymol), $C_6H_3 \cdot \overset{(1)}{CH_3} \cdot \overset{(2)}{OH} \cdot \overset{(4)}{C_3H_7}$ .

Das Carvacrol kommt in ätherischen Ölen vor und ist eine farblose Flüssigkeit, die in Wasser unlöslich ist. Der Geruch erinnert an Nelken. Siedepunkt = 233°; Spez. Gewicht (15°) = 0,983.

Mit Eisenchloridlösung versetzt, färbt sich die alkoholische Lösung blau und dann grün.

### 6. Naphthole (Oxynaphthaline), $C_{10}H_7OH$ .

Es gibt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphthol. Beides sind farblose Krystalle, die in Wasser schwer löslich sind und phenolartig riechen.

Physikalische Konstanten: Der Schmelzpunkt beträgt bei  $\alpha$ -Naphthol 95°, bei  $\beta$ -Naphthol 123°.

Reaktionen. Es färbt in Lösungen:

| $\alpha$ -Naphthol  | $\beta$ -Naphthol  |
|---|--|
| MILLONS Reagens rotbraun  | scharlachrot   |
| EJKMANS Reagens schön grün  | schwarzgrün  |
| Chlorwasser erzeugt weißen Niederschlag, der in Ammoniak farblos löslich ist. | weißen Niederschlag, der mit Ammoniak eine bläuliche Färbung gibt. |

## IX. Säuren.

### 1. Ameisensäure, $\text{H} \cdot \text{COOH}$ .

Eigenschaften s. Band I, S. 636 und 1023. — Nachweis und Bestimmung auch Band II, S. 1075. Ameisensäure spielt eine größere Rolle bei Methylalkoholvergiftungen.

#### a) Nachweis.

Über den Nachweis in Leichenteilen und Harn s. Methylalkohol, S. 1300. Die Ameisensäure ist im Rückstand des zweiten Destillates nach JUCKENACK enthalten, das vor der Destillation neutralisiert wurde. Man säuert mit verdünnter Schwefelsäure an und destilliert die freie Ameisensäure über.

$\alpha$ ) Quecksilberchlorid-Reaktion. Kocht man das fragliche Destillat mit Quecksilberchloridlösung, so scheidet sich bei Anwesenheit von Ameisensäure weißes Quecksilberchlorür aus.

$\beta$ ) Silber-Reaktion. Aus Silbernitratlösung scheidet Ameisensäure Silber aus, das sich an den Wandungen des Glases als glänzender Spiegel absetzt.

$\gamma$ ) Überführung in Formaldehyd. Nach FENTON<sup>1</sup> wird das Destillat schwach mit verd. Schwefelsäure angesäuert und unter langsamem Zusatz von Magnesiumspänen während einer Stunde eine lebhaft, aber nicht zu heftige Wasserstoffentwicklung unterhalten. Bei größeren Mengen Ameisensäure genügen zur Reduktion 4—5 Minuten. Im Filtrat kann man alsdann Formaldehyd nachweisen (S. 1308).

#### b) Bestimmung.

Da Ameisensäure quantitativ schwer überdestilliert, so verfährt man in der Weise, daß man etwa 300 ccm gemessene Flüssigkeit, auch Harn, mit etwa 30 ccm Phosphorsäure (25%) ansäuert und unter lebhaftem Sieden bis auf etwa 30 ccm abdestilliert. Alsdann setzt man 300 ccm Wasser zu und destilliert erneut; dieses ist so oft zu wiederholen, bis etwa 1500 ccm überdestilliert sind. Man kann zur Erkennung des Endes der Destillation auch so verfahren, daß man 10 ccm überdestilliert, mit Phenolphthaleinlösung versetzt und hierzu 1 Tropfen 0,1 N.-Alkalilauge zusetzt. Bleibt die Rotfärbung bestehen, so ist alle Ameisensäure überdestilliert.

Das Destillat wird mit aufgeschlämmtem Calciumcarbonat versetzt und gut durchgeschüttelt, alsdann wird es auf dem Wasserbade bis auf etwa 30 ccm eingedampft, vom Ungelösten abfiltriert und der Filtrückstand mit heißem Wasser ausgewaschen. Zum Filtrat in einem ERLNMEYER-Kolben fügt man 50 ccm kaltgesättigte Quecksilberchloridlösung und nach H. FINKE<sup>2</sup> 3—5 g Natriumacetat hinzu. Der Kolben, mit Steigrohr versehen, wird zwei Stunden auf einem lebhaft siedenden Wasserbade erhitzt. Das ausgeschiedene Quecksilberchlorür wird noch heiß in einem Filtriertiegel abfiltriert, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol und zuletzt mit Äther ausgewaschen, 1 Stunde bei 100—110° getrocknet und gewogen. Quecksilberchlorür  $\times$  0,0977 = Ameisensäure.

### 2. Essigsäure, $\text{CH}_3 \cdot \text{COOH}$ .

Eigenschaften s. Band I, S. 637. — Nachweis und Bestimmung auch Band II, S. 1081.

**Nachweis.**  $\alpha$ ) Die Essigsäure ist mit Wasserdämpfen flüchtig.

$\beta$ ) Essigester-Reaktion. Mit konz. Schwefelsäure und etwas Alkohol erwärmt, gibt Essigsäure sich durch den typischen Essigäther-Geruch zu erkennen.

$\gamma$ ) Eisenchlorid-Reaktion. Die neutralisierte essigsäure Lösung gibt auf Zusatz von 1—2 Tropfen Eisenchloridlösung eine tiefrote Färbung.

<sup>1</sup> JUCKENACK: Z. 1912, 24, 13.

<sup>2</sup> H. FINKE: Z. 1911, 22, 88.

δ) Kakodyl-Reaktion. Erwärmt man in einem Schmelzröhrchen Kaliumacetat mit Arsen trioxyd, so bildet sich der typische unangenehme Geruch nach Kakodyloxyd.

### 3. Salicylsäure (o-Oxybenzoesäure), $C_6H_4 \begin{matrix} OH \\ \diagdown \\ COOH \end{matrix}$ .

Eigenschaften s. Band I, S. 655 und 1034. — Nachweis und Bestimmung auch Band II, S. 1135.

#### a) Nachweis.

Die Salicylsäure ist mit Wasserdämpfen in sauren Lösungen leicht flüchtig. Das Destillat wird zur Isolierung der Salicylsäure mit Äther ausgeschüttelt, der ätherische Rückstand wird durch Umkrystallisation gereinigt. Salicylsäure wird durch den Harn sehr schnell ausgeschieden und zwar an Glucuronsäure oder Schwefelsäure, präformierte Schwefelsäure, gebunden.

α) Eisenchlorid-Reaktion. Eisenchloridlösung gibt bei Anwesenheit von Salicylsäure eine intensiv violette Färbung. Empfindlichkeit 1:50000.

β) Bromwasser-Reaktion. Bromwasser erzeugt einen weißen Niederschlag.

γ) MILLONS-Reagens. Auf Zusatz von MILLONSchem Reagens tritt eine blutrote Färbung auf.

δ) Salicylsäure-Methylester. Mit konz. Schwefelsäure und Methylalkohol erwärmt, bildet sich aus Salicylsäure der Methylester, dessen Geruch charakteristisch ist.

#### b) Bestimmung.

Die Bestimmung kann ähnlich wie beim Phenol mit Brom durchgeführt werden<sup>1</sup>. Auch auf colorimetrischem Wege lassen sich kleine Mengen Salicylsäure bestimmen<sup>2</sup>.

## X. Ester.

### Amylnitrit, $C_5H_{11}ONO$ .

Amylnitrit ist eine schwach gelbliche, leicht bewegliche, neutrale Flüssigkeit von fruchtartigem Geruch. Es verbrennt mit gelber, leuchtender, rußender Flamme. Bei Vergiftungen mit Amylnitrit bildet sich im Blut Methämoglobin. Nachweis s. S. 1431. Siedepunkt: 94—95°. Spez. Gewicht (15°) = 0,902—0,9026.

Nachweis. Im Destillat erkennt man den Ester am typischen Geruch. Mit Kalilauge verseift, bildet sich Amylalkohol und Kaliumnitrit, in welchem man Salpetrige Säure mit Jodzink-Stärkelösung nachweisen kann.

## XI. Organische Basen.

### 1. Anilin (Aminobenzol), $C_6H_5 \cdot NH_2$ .

Anilin ist eine stark lichtbrechende, farblose, ölige Flüssigkeit von eigenartigem, aromatischem Geruch. In Wasser ist Anilin 1:30 löslich. Als Base gibt es mit Säuren Salze. Siedepunkt = 184,5°; Spez. Gewicht (15°) = 1,025.

#### Nachweis.

Anilin geht als schwache Base in weinsaurer Lösung mit Wasserdämpfen über. Besser ist es, aus stark alkalischer Lösung das Anilin mit Wasserdämpfen überzutreiben. Es bleiben aber ziemlich große Mengen im wäßrigen Destillat gelöst; durch Zusatz von Natriumchlorid kann man die Löslichkeit im Wasser herabdrücken und das Anilin ausäthern. Anilin ist ein typisches Blutgift. Der

<sup>1</sup> Zeitschr. analyt. Chem. 1899, 38 298.

<sup>2</sup> FREUND: Leitfaden der colorimetrischen Methoden.

Blutfarbstoff wird in Methämoglobin umgewandelt (s. S. 1431). Das Blut bekommt eine schokoladenbraune Färbung.

α) Holzspan-Reaktion. Ein Fichtenspan wird durch wäßrige Anilinlösung gelb gefärbt.

β) Isonitril-Reaktion. Versetzt man einige Kubikzentimeter des Destillates mit einigen Tropfen Chloroform und etwas Kalilauge, so entsteht nach dem Erwärmen der unangenehme Isonitril-Geruch.

3. Chlorkalk-Reaktion. Wird das Destillat tropfenweise mit wäßriger Chlorkalk- oder Natriumhypochloritlösung versetzt, so tritt bei Anwesenheit von Anilin eine violettblaue Färbung auf, die allmählich in Rot übergeht. Wird alsdann wenig Phenollösung zugesetzt, die schwach ammoniakalisch ist, so tritt eine tiefblaue Färbung ein. Schärfe des Nachweises 1:60000.

4. Bromwasser-Reaktion. Das Destillat gibt auf Zusatz von Bromwasser bei Anwesenheit von Anilin einen fleischfarbigen Niederschlag. Schärfe der Reaktion: 1:60000.

Über den Nachweis des Methämoglobins s. S. 1431.

## 2. Methylierte Aniline.

o-, m- und p-Toluidin, die sich untereinander durch ihre Siedepunkte unterscheiden, sind viel giftiger und geben die gleichen Reaktionen wie Anilin. Siedepunkte: = o-Toluidin 197°, m-Toluidin 200°, p-Toluidin 198°; Schmelzpunkt des p-Toluidin 43°.

## XII. Nitroverbindungen.

### 1. Nitrobenzol (Mirbanöl), $C_6H_5 \cdot NO_2$ .

Das Nitrobenzol ist eine gelbliche, stark lichtbrechende, nach Bittermandelöl riechende Flüssigkeit, die in Wasser fast unlöslich ist. Siedepunkt = 209°; Spez. Gewicht (15°) = 1,209.

Nachweis. Schon der äußerst starke Geruch, auch in Leichenteilen, läßt erkennen, daß es sich entweder um Bittermandelöl oder Nitrobenzol handeln muß. Das gewonnene Destillat scheidet bei Anwesenheit von Nitrobenzol ölige Tröpfchen ab, die durch Ausschütteln mit Äther gewonnen werden können. Nach dem Verdunsten des Äthers bleibt Nitrobenzol als gelbliches Öl von typischem Geruch zurück. Das Nitrobenzol ist ein starkes Blutgift. Bei Vergiftung damit wird das Blut schokoladenbraun gefärbt; es bildet sich dabei Methämoglobin. Nachweis s. S. 1431.

Überführung in Anilin. Man löst einige Tröpfchen des Öles oder wenige Kubikzentimeter des gut geschüttelten Destillates in Alkohol und setzt Zink und Salzsäure hinzu. Nach einiger Zeit, wenn der entwickelte Wasserstoff genügend reduziert hat und nachdem der Geruch nach Nitrobenzol verschwunden ist, wird die Reaktion durch Abgießen der wäßrig-alkoholischen Lösung unterbrochen und Natronlauge im Überschuß zugesetzt. Das frei gewordene Anilin schüttelt man mit Äther aus. Nach dem Verdunsten des Äthers kann man mit dem Rückstand die Reaktionen auf Anilin (S. 1318) ausführen.

### 2. Nitrotoluole, $C_6H_5 \begin{matrix} NO_2 \\ \diagdown \\ CH_3 \end{matrix}$ .

Die in der chemischen Industrie eine Rolle spielenden Nitrotoluole zählen ebenfalls zu den starken Giften und verhalten sich beim Nachweis ähnlich wie Nitrobenzol.

## XIII. Ätherische Öle.

Ätherische Öle werden zuweilen als Abortivmittel benutzt. Sie sind mit Wasserdämpfen flüchtig und lassen sich aus den Destillaten durch Zusatz von



Natriumchlorid aussalzen und durch Ausschüttelung mittels gereinigten Petroläthers und dessen Verdunsten bei gewöhnlicher Temperatur anreichern.

Typische Nachweismethoden zur einwandfreien Identifizierung fehlen.

### 1. Sadebaumöl (Oleum Sabinae).

Die Zweigspitzen des Juniperus Sabina enthalten ein mit Wasserdämpfen flüchtiges Öl. Das Öl ist farblos oder gelblich und dünnflüssig, dreht das polarisierte Licht stark nach rechts und besitzt einen durchdringenden, widerlichen Geruch. Es besteht aus verschiedenen Terpenen. Bei Vergiftungen ist vor allen Dingen auf typische Fragmente der Zweigspitzen im Darm und Magen zu fahnden. Der Harn riecht nach dem Öl und enthält Sabinolglucuronsäure.

Nachweis. Die Zweigspitzen zeigen nach dem Abkochen eine rote Färbung. Auf Leinen hinterlassen sie einen roten Fleck. Im Harn kann man die Sabinolglucuronsäure nachweisen; man verfährt dabei in folgender Weise: Der neutrale oder schwach saure Harn wird mit neutralem Bleiacetat versetzt und filtriert. Zum ammoniakalisch gemachten Filtrat gibt man solange Bleiessig, bis noch ein Niederschlag entsteht. Der gesammelte und ausgewaschene Bleiniederschlag wird mit verd. Schwefelsäure zerlegt und das Filtrat mit Bariumcarbonat neutralisiert. Das Filtrat vom Bariumsulfatniederschlag wird alsdann im Vakuum über Schwefelsäure eingeengt und dem Rückstand heiße konz. Strychninsulfatlösung zugesetzt. Es scheidet sich eine Doppelverbindung von sabinolglucuronsaurem Strychnin aus, das bei 196—197° scharf schmilzt.

### 2. Senföl, Isothiocyanallyl, $C_3H_5 \cdot N : C : S$ .

Das Senföl ist ein helles bis gelblich gefärbtes, stark lichtbrechendes Öl von typischem Geruch, das auf der Haut Blasen zieht. Siedepunkt = 149°; Spez. Gewicht (15°): 1,020.

Nachweis. Das Destillat riecht intensiv nach Senföl. Wie schon erwähnt, werden auf der Haut Blasen erzeugt. Schüttelt man das Destillat bei Gegenwart von Alkohol mit 12%igem Ammoniak, so entsteht Thiosinamin,

$$\begin{array}{l} \text{NHC}_3\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{C}=\text{S} \\ \diagdown \\ \text{NH}_2 \end{array},$$
 das beim Verdunsten als farblose Krystalle vom Schmelzpunkt 74° zu erhalten ist.

## XIV. Kohlenwasserstoffe.

### 1. Petroleum.

Durch Einatmung der Dämpfe von Benzin, Ligroin und Petroleum können tödliche Vergiftungen hervorgerufen werden. Durch Einnahme dieser Kohlenwasserstoffe kann wohl eine vorübergehende Erkrankung entstehen.

Nachweis. Da die aliphatischen Kohlenwasserstoffe chemisch nur wenig angreifbar sind, so gibt es keine brauchbaren chemischen Reaktionen. Mit Wasserdämpfen sind die Kohlenwasserstoffe flüchtig. Lediglich durch die Ausscheidung von öligen Tröpfchen, die auf der Oberfläche des wäßrigen Destillates sich befinden, und durch den typischen Geruch der Kohlenwasserstoffe zeigen sie sich an. Weitere Eigenschaften sind kaum feststellbar. Es mag noch erwähnt werden, daß die Kohlenwasserstoffe in 90%igem Alkohol nicht löslich und im Butterrefraktometer durch eine niedrige Brechung (35—50°) charakterisiert sind. Auch sind diese Kohlenwasserstoffe weder durch alkoholische Kalilauge verseifbar, noch werden sie durch eine Mischung von konz. Salpetersäure und Schwefelsäure nitriert.

## 2. Benzol, $C_6H_6$ .

Benzol ist eine farblose, eigenartig riechende Flüssigkeit, die mit stark rußender Flamme brennt. Siedepunkt =  $80,5^{\circ}$ ; Spez. Gewicht ( $15^{\circ}$ ) = 0,8841.

Nachweis. Benzol ist längere Zeit im Organismus nachweisbar, nur langsam wird es in Phenol übergeführt. Im Harn tritt eine Vermehrung der präformierten Schwefelsäure als Phenolschwefelsäure ein.

Man verfährt bei Leichenteilen zum Nachweise von Benzol am besten in der Weise, daß man die Destillation nach vorheriger Ansäuerung mit verd. Schwefelsäure vornimmt und das Destillat mittels eines Vorstoßes in etwa 100 ccm Tetrachlorkohlenstoff auffängt. Dann trennt man in einem Scheidetrichter den Tetrachlorkohlenstoff vom Wasser, bringt ihn in eine Stöpselflasche, setzt 10 ccm einer Mischung von 2 Vol. rauchender Salpetersäure und 1 Vol. konz. Schwefelsäure zu und schüttelt die Mischung 10 Minuten lang kräftig durch. Alsdann verdampft man den Tetrachlorkohlenstoff in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade. Der Rückstand enthält neben Schwefelsäure und Salpetersäure, falls Benzol vorhanden war, Dinitrobenzol. Er wird mit Wasser verdünnt, in einen Scheidetrichter gebracht, mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und mit Äther nochmals ausgeschüttelt. Der Äther wird zur Entwässerung mit wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und nach einiger Zeit abfiltriert. Nach dem Verdunsten des Äthers in einer Schale bleiben Krystalle des Dinitrobenzols zurück, das durch Reduktion mit Zinn und Salzsäure in wäßriger Lösung in Diamidobenzol umgewandelt wird und durch Überführung in Bismarckbraun vermittels Nitrit erkannt werden kann.

## 3. Naphthalin, $C_{10}H_8$ .

Naphthalin bildet farblose, glänzende Krystalle von typischem Geruch. Schmelzpunkt  $79,2^{\circ}$ .

Nachweis. Mit Wasserdämpfen ist Naphthalin flüchtig und scheidet sich auf dem wäßrigen Destillat in Krystallen ab. Durch Ausäthern können diese vom Wasser getrennt und durch den Schmelzpunkt charakterisiert werden.

Zweiter Teil.

# Organische Gifte,

soweit sie nicht mit Wasserdämpfen flüchtig sind.

## I. Allgemeiner Teil.

### 1. Allgemeiner Untersuchungsgang.

Allgemein verfährt man bei der Untersuchung von Leichenteilen, oder wenn es sich um wäßrige Lösungen handelt, die auf Gifte dieser Art geprüft werden sollen, so, daß man die Leichenteile fein zerkleinert, während man wäßrige Lösungen, z. B. Kaffee oder Tee, zuvor auf dem Wasserbade bis zu einem dünnen Sirup verdickt, dann mit Weinsäure schwach ansäuert und mit einer hinreichenden Menge Alkohol, etwa der dreifachen Gewichtsmenge, unter Erwärmen bei  $60^{\circ}$  in einem Kolben mit Steigrohr auszieht. Man läßt den Kolben unter häufigem Schütteln etwa 15—20 Minuten auf dem Wasserbade stehen, nimmt ihn dann vom Wasserbade weg, schüttelt den Inhalt während einer Stunde noch häufig durch und filtriert nach dem Erkalten auf einer Nutsche die Flüssigkeit ab. Falls sie nicht mehr sauer reagieren sollte, so ist erneut etwas Weinsäure zuzusetzen. Der Rückstand wird noch zweimal

in der gleichen Weise mit Alkohol extrahiert. Die vereinigten Auszüge werden alsdann auf dem Wasserbade bei geringer Temperatur oder im Vakuum eingengt, wodurch die Einengung wesentlich beschleunigt und die Umsetzung leicht zersetzlicher Körper, wie z. B. Physostigmin und Glucoside, hintangehalten wird. Ratsam ist es, Gehirnmasse stets getrennt zu verarbeiten.

In dem alkoholischen Auszug gehen einige giftige Eiweißstoffe, die jedoch meist eine untergeordnete Bedeutung besitzen, wie Ricin, Abrin, Krotin und andere in Lösung; sie sind gegebenenfalls durch wäßrige Extraktion zu gewinnen und können nur physiologisch nachgewiesen werden. Auch befinden sich die meisten Metallgifte im Rückstand. In Lösung gehen außer den Pflanzengiften und Arzneimitteln verschiedene Quecksilbersalze und auch organisch gebundene Metallverbindungen.

Der Verdampfungsrückstand des alkoholischen Auszuges stellt meist eine bräunliche, sirupartige Masse dar, die in der Regel nur gering ist, aber auch, je nach der Menge der verwendeten Leichteile, mehr betragen kann. Diesen Rückstand verrührt man langsam mit Hilfe eines Pistills und gebogenen Spatels mit wenig Wasser und setzt nach und nach mehr Wasser zu, bis zu etwa 100—150 ccm.

Man überzeugt sich, ob die wäßrige Lösung noch sauer reagiert, was der Fall sein muß. Alsdann läßt man sie einige Zeit stehen, wobei sich Eiweißstoffe und Peptone abscheiden, die die fettigen Bestandteile meist an sich reißen. Man filtriert durch ein angefeuchtetes Filter, gießt zuletzt die Trübungsstoffe mit auf das Filter und wäscht den Rückstand auf dem Filter mit Wasser aus. Wenn man die wäßrige Lösung wenige Stunden stehen läßt, so klärt sie sich; die Trübungsstoffe setzen sich

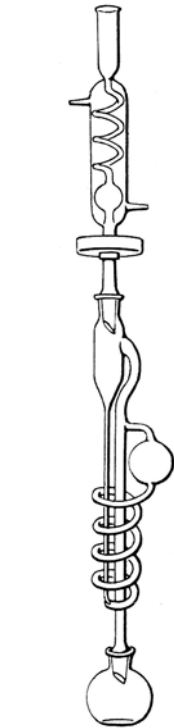


Abb. 11.  
Perforationsapparat.  
(Nach PARTHEIL und  
ROSE.)

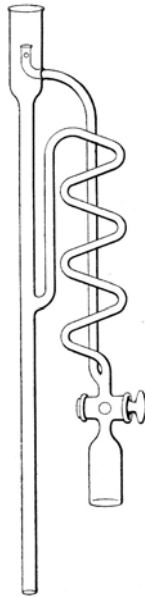


Abb. 12. Universal-  
apparat für schwere  
und leichte Extrak-  
tionsmittel.  
(Nach GADAMER.)

fest zu Boden und die Filtration geht wesentlich schneller vonstatten.

Die auf dem Filterchen verbleibenden Rückstände und auch das Fett können Bitterstoffe, Ricinusöl, Krotonöl, Harze und in Fett lösliche Körper enthalten.

Man kann diesen Rückstand mit wenig heißem Wasser und mit Alkohol auskochen. Etwa vorhandene Gifte oder Arzneimittel würden alsdann nach dem Eindampfen der wäßrigen oder alkoholischen Lösung sich ausscheiden.

Mit dem fettigen Rückstand kann man auch eine Hautreaktion vornehmen. Man streicht etwas von dem Fett auf ein kleines Lämpchen und befestigt es auf dem Oberarm. Sind nach einigen Stunden keine Hautreize vorhanden, so sind Vesicantia nicht zugegen.

Die wäßrige klare Lösung des alkoholischen Auszuges wird nun auf dem Wasserbade unter Benutzung einer Absaugvorrichtung für die Dämpfe bei

gelinder Wärme eingeengt, bis eine sirupöse Flüssigkeit zurückbleibt. Diesen Sirup verreibt man mit etwas absolutem Alkohol, von dem man langsam unter fortwährendem Durchkneten der sich ausscheidenden Eiweißstoffe soviel zugibt, etwa 100—150 ccm, bis keine weitere Trübung mehr entsteht. Nach dem Absetzen der Ausscheidungsprodukte filtriert man die alkoholische Lösung ab und wäscht den Rückstand auf dem Filter mit wenig Alkohol aus. Den alkoholischen Auszug engt man, wie oben beschrieben ist, auf dem Wasserbade ein, nimmt den sirupösen Rückstand mit Wasser auf und filtriert die wäßrige Lösung vom Ungelösten ab. Zur weiteren Reinigung können die in Abb. 11 und 12 abgebildeten Extraktionsapparate nach PARTHEIL und nach GADAMER dienen.

## 2. Methoden der Reinigung von Alkaloiden und alkaloidähnlichen Giften.

Um eindeutige Reaktionen oder physikalische Konstanten (Schmelzpunkte usw.) zu erhalten, ist es in vielen Fällen geboten, eine weitere Reinigung, als sie eben beschrieben ist, vorzunehmen.

Allgemein sind die auf verschiedene Weise gewonnenen Rückstände durch Lösen in Wasser und erneute Ausschüttlung in schwach saurer oder alkalischer Lösung weiter zu reinigen. Reinigung über die Doppelsalze s. S. 1340.

Ein wichtiges Hilfsmittel zur Reinigung der isolierten Gifte, die man nach erneutem Lösen in Wasser und erneuter Ausschüttlung mit Äther nicht mehr weiter reinigen kann, ist die

### Mikrosublimation.

Die Mikrosublimation liefert nicht allein in den meisten Fällen ein einheitliches, reines Sublimat, sondern man kann auch auf Grund der Temperatur, bei der sie erfolgt, Schlüsse auf die Art des fraglichen Stoffes ziehen.

Der beste, allerdings auch teuerste Apparat hierzu ist der von W. C. HERAEUS angefertigte Mikrosublimationsapparat bei gewöhnlichem Luftdruck, der nach den Versuchen von KEMPF außerordentlich befriedigende Resultate zeitigt.

α) Verfahren nach KEMPF<sup>1</sup>.  
Um diese Mikrosublimation durchzuführen, bedient man sich der Apparatur von W. C. HERAEUS-Hanau (Abb. 13).

Eine Platte wird elektrisch geheizt. Die Regulierung der Heizung, die auf 1° genau ist, geschieht durch eine mit Skala versehene Schraubentrommel, mit der Temperaturen bis zu 300° erreicht werden können. Die Platte besitzt eine Bohrung, in die das Thermometer eingeführt werden kann. Die Substanz wird auf eine

etwa 1 mm dicke Unterlage aus Glas, Glimmer oder eine vernickelte Messingplatte in möglichst dünner Schicht aufgetragen. Man kann auch wäßrige Lösungen auf der Unterlage zuvor verdunsten lassen. Um die Unterlage legt man eine etwa 3 mm dicke, ausgeschnittene Asbestplatte, die die Kammer umschließt, und auf die Asbestplatte einen Objektträger. Um der Sublimationskammer einen besseren Halt zu geben, bedeckt man

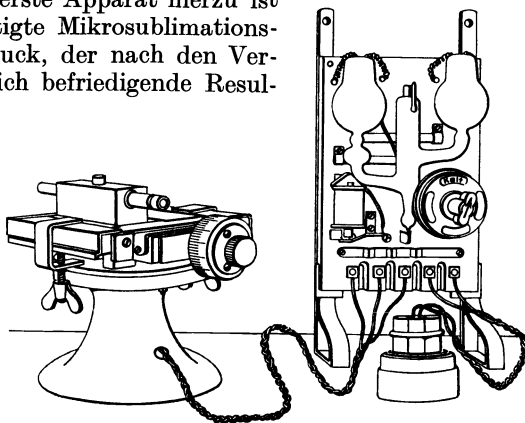


Abb. 13. Mikrosublimationsapparat. (Nach KEMPF.)

<sup>1</sup> KEMPF: Zeitschr. analyt. Chem. 1923, 62, 284.

den Objektträger mit einer etwa 5 mm dicken ausgestanzten Asbestplatte so, daß der Objektträger frei bleibt. Unter Umständen kann man ihn noch durch eine Kühlvorrichtung abkühlen.

Nach Beschickung der Kammer wird die Temperatur allmählich, etwa von Stunde zu Stunde, um  $10^{\circ}$  erhöht. Sobald man einen hauchartigen Anflug eines Sublimates auf dem Objektträger beobachtet, wird die Temperatur nicht mehr gesteigert. Nach wenigen Stunden ist die Sublimation beendet.

**β) Verfahren nach EDER<sup>1</sup>.** Bei diesem Verfahren nimmt man die Mikrosublimation im Vakuum vor.

Wie aus der Abb. 14 zu ersehen ist, besteht die Sublimationsvorrichtung aus einem dickwandigen Rohr von etwa 2,5 cm Durchmesser und 5 cm Länge, das mit einem Gummistopfen, durch welchen ein Glasrohr mit Glashahn führt, verschlossen ist. Das dickwandige Rohr selbst ist unten etwa auf  $\frac{3}{4}$  cm verjüngt und besitzt Näpfchenform. In die Vertiefung bringt man die zu sublimierende Substanz entweder in pulverisiertem Zustand oder in Lösung und entfernt das Lösungsmittel vorher durch Erwärmen. Alsdann legt man ein rundes

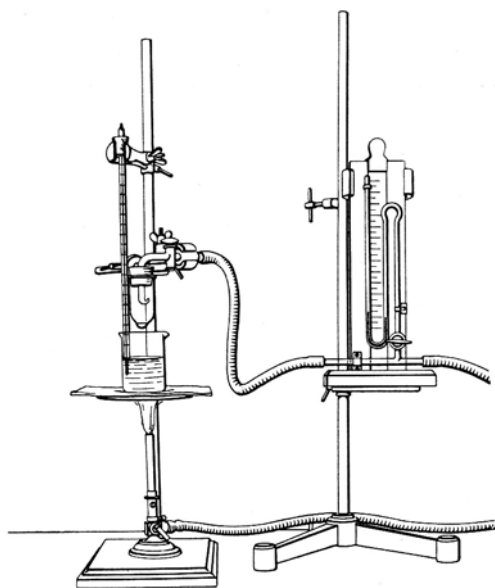


Abb. 14. Mikrosublimationsapparat. (Nach EDER.)

Deckgläschen auf die verengte Stelle und evakuiert auf etwa 10 mm Innendruck. Nun senkt man das Gläschen in konz. Schwefelsäure, die sich in einem Bechergläse befindet, soweit ein, daß nur die untere Spitze des Näpfchens in die Schwefelsäure taucht, hängt ein abgekürztes Thermometer in die Schwefelsäure, so daß die Quecksilberkugel unmittelbar neben dem Näpfchen sich befindet, und wärmt das auf einer Asbestplatte stehende Bechergläschen mittels eines Bunsenbrenners langsam an. Durch einen Rührer aus Glas sorgt man dafür, daß die Temperatur der Schwefelsäure gleichmäßig verteilt wird. Sobald man sieht, daß sich das Deckgläschen trübt, ein Zeichen, daß die Sublimation einsetzt, steigert man die Temperatur nicht mehr und wartet, bis die Sublimation beendet ist. Die Steigerung der Temperatur bis auf etwa  $160^{\circ}$  darf nicht schneller als innerhalb 12 Minuten, bis auf  $200^{\circ}$ , von  $25^{\circ}$  an gerechnet, als innerhalb 25 Minuten erreicht werden.

nommen, nach dem Erkalten die Schwefelsäure vorsichtig geöffnet.

Zu bemerken ist noch, daß die Substanz vor der Sublimation im Vakuum über Schwefelsäure gut getrocknet werden muß. Die Substanz muß eng an den Wandungen des Näpfchens anliegen und darf durchschnittlich nicht mehr als 1 mg betragen. Um zu verhüten, daß bei Nachlassen des Druckes der Wasserstrahlpumpe Wasser in die Apparatur steigt, schaltet man eine umgekehrte Saugflasche oder ein Rückschlagventil ein.

Die nach der einen oder anderen Art erhaltenen Sublimate, die amorph oder kristallin sein können, werden der weiteren Untersuchung unterzogen. Zum Vergleich stellt man sich Sublimate der in Betracht kommenden reinen Substanzen her.

Sublimationstemperaturen nach EDER. Die Temperaturen bezeichnen die bei einem Druck von 7–12 mm sich bildenden Sublimate. Unter Umständen kann man eine Trennung zweier Körper, deren Sublimationstemperatur weiter auseinander liegen, erreichen.

<sup>1</sup> EDER: Vierteljahrsschr. naturforsch. Ges. Zürich 1912, 55, 291.

## Sublimationstemperaturen nach EDER.

|                        |          |                          |          |   |                    |
|------------------------|----------|--------------------------|----------|---|--------------------|
| Cocain . . . . .       | 75—90°   | Pilocarpin-HCl . . . . . | 121—133° | Delphinin . . . . .                               | 155—166°           |
| Homatropin . . . . .   | 81—92°   | Theobromin . . . . .     | 125—138° | Apomorphin-HCl . . . . .                          | 157—175°           |
| Coffein . . . . .      | 81—94°   | Hydrastin . . . . .      | 128—144° | Brucin . . . . .                                  | 158—175°           |
| Atropin . . . . .      | 93—110°  | Piperin . . . . .        | 130—147° | Yohimbin . . . . .                                | 165—175°           |
| Hyoscyamin . . . . .   | 94—107°  | Chinidin . . . . .       | 136—146° | Strychnin . . . . .                               | 165—175°           |
| Physostigmin . . . . . | 97—112°  | Papaverin . . . . .      | 132—149° | Solanin . . . . .                                 | 168—184°           |
| Cantharidin . . . . .  | 98—110°  | Chinin . . . . .         | 133—148° | Emetin . . . . .                                  | 170—180°           |
| Codein . . . . .       | 100—130° | Cinchonin . . . . .      | 134—155° | Narcein . . . . .                                 | 171—186°           |
| Pilocarpin . . . . .   | 110—120° | Cinchonidin . . . . .    | 137—148° | Aconitin . . . . .                                | 176—190°           |
| Thebain . . . . .      | 111—127° | Narkotin . . . . .       | 146—156° | Veratrin . . . . .                                | 180—200°           |
| Arecolin-HBr . . . . . | 115—133° | Scopolamin-HBr . . . . . | 146—160° | Sparteïn-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . . | } kein<br>Sublimat |
| Coniin-HBr . . . . .   | 120—139° | Morphin . . . . .        | 150—190° | Nicotin-HCl . . . . .                             |                    |

EDER gliedert die Sublimate der von ihm untersuchten Alkaloide in 5 Gruppen, die in 3 Hauptgruppen zusammengefaßt werden können:

Hauptgruppe A: Stoffe, die ohne zu schmelzen sublimieren.

1. Stoffe, die anscheinend direkt krystalline Sublimate geben: Coffein, Theobromin, Cinchonin, Solanin, Cantharidin.

2. Stoffe, deren erstes Sublimat aus Tröpfchen besteht, die unter dem Mikroskop wenigstens als solche erscheinen. Im weiteren Verlauf der Sublimation bilden sich alsdann in dem Anhauch der sublimierten Substanz Krystalle; zu diesen zählen: Strychnin, Morphin, Apomorphinhydrochlorid, Codein, Thebain, Narkotin, Pilocarpinhydrochlorid, Jöhimbin, Cinchonidin, Chinidin, Chinin, Coniinhydrobromid, Arecolinhydrobromid, Hyoscyamin.

3. Stoffe, die bei der Sublimation zuerst amorphe Tröpfchen abscheiden, die jedoch keine oder nicht regelmäßige Krystalle bilden: Cocain, Brucin, Papaverin, Piperin, Atropin, Homatropin, Physostigmin, Hydrastin; ferner solche Stoffe, die stets tröpfchenförmig bleiben: Aconitin, Delphinin, Scopolamin als Bromid.

Hauptgruppe B: Stoffe, die erst über dem Schmelzpunkt Sublimate geben und aus Tröpfchen ohne Krystallbildung bestehen: Narcein, Pilocarpin, Veratrin, Emetin, Colchicin.

Hauptgruppe C: Stoffe, die kein Sublimat geben; vielleicht tritt hier Zersetzung ein: Nicotin als Chlorid, Spartein als Sulfat.

Wenn auch diese Einteilung eine allgemeine Gültigkeit hat, so können doch Übergänge vorkommen.

Nach dem KEMPFSchen Verfahren kommt man vielfach mit viel niedrigeren Temperaturen aus als nach EDER, was sicher als Vorzug zu bewerten ist. Die durch die Mikrosublimation oder durch Krystallisation aus der Ätherauschüttelung erhaltenen Krystalle können weiterhin noch durch physikalische Untersuchungen identifiziert werden.

### 3. Allgemeine Verfahren des Nachweises.

a) Bestimmung des Brechungsindex nach P. KLEY<sup>1</sup>. Er hat diese Methode zur Identifizierung der Alkaloide ausgearbeitet. Farblose Krystalle sind um so deutlicher zu erkennen, je größer der Unterschied der Brechungsexponenten des Krystalls und des ihn umgebenden Mediums ist. Zur Bestimmung der Brechungsindices isotroper Krystalle hat man also nur nach einer Einbettungsflüssigkeit von bekanntem Brechungsexponent zu suchen, bei deren Anwendung die Kanten des Krystalls, unter dem Mikroskop betrachtet, unsichtbar werden, und kann dann Rückschlüsse auf das zu ermittelnde Brechungsvermögen des betreffenden Krystalls ziehen.

Bei anisotropen Krystallen, und zu diesen gehören sämtliche bekannten Alkaloide, ist dieses Verfahren nur anwendbar, wenn man paralleles und polarisiertes Licht verwendet und die Brechungsexponenten auf bestimmte Richtungen im Krystall bezieht. Man erhält so 2 oder 3 Zahlen, die für die betreffende Substanz charakteristisch sind.

<sup>1</sup> P. KLEY: Zeitschr. analyt. Chem. 1904, 43, 160.

Zur Ausführung dieser Methode benötigt man lediglich ein Polarisationsmikroskop und eine Reihe von Einbettungsflüssigkeiten mit bekannten Brechungsindices, die man zur Sicherheit öfters im ABBÉschen Refraktometer kontrolliert. Wenn man die Versuchsbedingungen von KLEY genau einhält, bekommt man noch zuverlässige Ergebnisse bei 500—1000facher Vergrößerung an Krystallen von 3  $\mu$ .

Da die freien Alkaloide vielfach schwerer krystallisieren als ihre Salze, wurden die letzteren öfters zur Durchführung dieser optischen Identifizierung herangezogen.

**b) Bestimmung des Spezifischen Drehungsvermögens.** Man bedient sich der Mikropolarisation in Röhren, die nur einen Durchmesser von 1 mm besitzen. Da viele Alkaloide optisch aktiv sind und bei einzelnen das optische Drehungsvermögen ziemlich groß ist, kann durch das Spezifische Drehungsvermögen die Art des Giftes bzw. des Alkaloides erkannt und auch die Menge bestimmt werden. Wichtig ist, daß die freien Basen häufig eine andere Drehungsrichtung besitzen als ihre Salze.

**c) Mikroreaktionen.** Es sei hier auf das Werk von H. BEHRENS<sup>1</sup> und L. EKKERT<sup>2</sup> verwiesen. Man läßt die Reaktion unter dem Deckgläschen vor sich gehen, auf dem sich die Substanz befindet. Die Beobachtung erfolgt unter dem Mikroskop.

**d) Absorptionsphotometrie.** Näheres hierüber s. Bd. II, S. 353.

**e) Weitere allgemeine Erkennungsreaktionen.** Der durch Ausschüttelung mit Äther oder durch Sublimation gewonnene Rückstand wird einer weiteren Prüfung unterzogen.

$\alpha$ ) Aussehen des Rückstandes. Ob ölig, krystallin oder in Lösung sich Fluoreszenz zeigt.

$\beta$ ) Geruch und Prüfung auf der Zungenspitze. Mäusegeruch kann von Coniin herrühren. Unempfindlichkeit wird durch Cocain und seine synthetischen Ersatzmittel hervorgerufen. Bitteren Geschmack zeigen viele Alkaloide, stark bitter ist Strychnin.

$\gamma$ ) Schmelzpunkt. Er wird in bekannter Weise bestimmt. Schließt man aus dem Schmelzpunkt auf ein bestimmtes Gift oder stark wirkendes Arzneimittel, so muß eine Mischung des fraglichen Körpers mit dem reinen vermuteten Körper den gleichen Schmelzpunkt aufweisen.

$\delta$ ) Siedepunkt. Er wird, wie auf S. 1293 ausgeführt, bestimmt.

$\epsilon$ ) Nachweis von Stickstoff in organischer Bindung. Über diesen Nachweis s. unter Veronal S. 1369.

Weiterhin haben die Untersuchungen, wie schon erörtert, sich auf die Sublimare nach KEMPF oder EDER zu erstrecken. Auch kann hier ein physiologischer Versuch an einem Frosch oder einer Maus weiteren Aufschluß geben, s. S. 1327.

Nachdem man so gewisse Anhaltspunkte erhalten hat, werden die für verschiedene Gifte und Arzneimittel charakteristischen Spezialreaktionen ausgeführt, s. unter IV., und zwar zuerst die Reaktionen, die der vermuteten Substanz zukommen.

#### 4. Allgemeine Alkaloidreaktionen.

Zur Prüfung, ob der Verdampfungsrückstand Alkaloide überhaupt enthält, löst man etwas von dem Rückstand in einigen Tropfen 0,1 N.-Salzsäure und Wasser, gibt hiervon einige Tropfen auf verschiedene Uhrgläser und fügt dann

<sup>1</sup> H. BEHRENS: Mikrochemische Analyse organischer Verbindungen und mikroskopische Technik. Verlag. Leop. Voß.

<sup>2</sup> L. EKKERT: Erkennung organischer Verbindungen im besonderen von Arzneimitteln. Stuttgart: Verlag Ferdinand Enke.

folgende sog. allgemeine Alkaloidreagenzien, wie Wismutjodidjodkalium, Quecksilberjodidjodkalium, Cadmiumjodidjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Platinchloridchlorwasserstoffsäure, Goldchloridchlorwasserstoffsäure, Tanninlösung u. a. hinzu.

Diese Reagenzien erzeugen mit Alkaloiden Niederschläge, deren Farbe bei einzelnen Alkaloiden einige Schlüsse zuläßt. Entstehen keine Niederschläge mit diesen Reagenzien, so sind Alkaloide nicht zugegen, ein positiver Ausfall der Reaktionen ist aber noch kein Beweis für das Vorhandensein von Alkaloiden, da Niederschläge auch durch andere Stoffe sich bilden können, Verunreinigungen usw., was häufig der Fall ist. Ratsam ist es auch, den etwa vorhandenen Stickstoff nachzuweisen. Man schmilzt einige Kryställchen mit metallischem Natrium im Reagensglas zusammen und führt die Berlinerblaureaktion aus, s. S. 1288, 1369.

Nun schreitet man zu den speziellen Nachweisen der in der sauren wäßrigen Lösung durch Äther ausschüttelbaren stark wirkenden Arznei- und Giftstoffe, die später (S. 1330), nachdem alle Ausschüttelungsverfahren, in saurer und alkalischer Lösung, besprochen sind, angeführt werden.

In dieser Gruppe finden sich hauptsächlich: Mekonin, Colchicin, Pikrotoxin, Santonin, Cantharidin, Pikrinsäure, Nitrokresole, und ferner die Arzneimittel: Acetanilid, Phenacetin, Resorcin, Pyrogallol, Salicylsäure, Veronal und andere, Bromural, Piperin, Capsaicin, Anthrachinon, Phenolphthalein. Antipyrin, Coffein sowie Pyrogallol findet man nur in Spuren in der sauren Ausschüttelung.

Wie schon oben (S. 1322) erwähnt, gehen auch Metallsalze in organischer oder anorganischer Bindung in Lösung, dieses trifft namentlich für Quecksilbersalze und Quecksilbercyanid zu. Der Nachweis ist unter den betreffenden Metallen zu ersehen.

## 5. Vorprüfung der sauren wäßrigen Lösung.

Um Fingerzeige zu erhalten, wie man die nach S. 1321 erhaltene wäßrige Lösung weiter behandeln soll, können nachstehende Versuche dienen.

Wenn die Lösung bzw. ein Teil davon besonders nach Zusatz von verd. Schwefelsäure fluoresciert, was unter der Ultralampe leicht feststellbar ist, so können Hydrastin-, Gelsemin- oder Solaneengifte vorhanden sein; nach Zusatz von Alkalien auftretende Fluorescenz läßt  $\beta$ -Naphthol vermuten. Ist die wäßrige Lösung gelb gefärbt, so können Derivate des Anthrachinons, des Berberins oder Gummigutti zugegen sein.

Starkes Schäumen der Lösung läßt auf Anwesenheit von Saponinen schließen.

Ein Zusatz von einem Tropfen Eisenchloridlösung ruft in der nur schwach sauren Lösung eine Veränderung der Färbung bei Anwesenheit von Phenolen oder ihren Derivaten hervor.

Ferner ist es ratsam, eine geringe Menge des wäßrigen Auszuges auf Arsen und Quecksilber zu prüfen, deren Anwesenheit den Nachweis der Alkaloide erschweren kann. Zu diesem Zweck wird eine geringe Menge des Auszuges mit reinem Natriumcarbonat gemischt und eingetrocknet. Den Rückstand bringt man in ein Glühröhrchen und erwärmt. Tritt ein Geruch nach Knoblauch auf, so ist auf die Anwesenheit von Arsen zu schließen. Es kann sich das Arsen entweder als schwarzer Belag im Glühröhrchen zeigen oder als weißes, krystallines Sublimat (Arsenige Säure). Kleine glänzende Tröpfchen, die man unter dem Mikroskop besser sichtbar machen kann, würden von Quecksilber herrühren.

Physiologische Prüfung. Spritzt man eine kleine Menge der fast neutralen oder neutralisierten Lösung einer Maus unter die Haut, so zeigt das



Tier bei Anwesenheit von Giften Krankheitserscheinungen, die oft auch über die Art des Giftes, Strychnin, Morphin usw., Aufschluß geben können. Treten keine Erscheinungen auf, so ist anzunehmen, daß in der Lösung keine Gifte vorhanden sind.

Werden einige Tropfen des neutralisierten Auszuges einer Katze in das Auge geträufelt, so kann eine Verengerung oder Erweiterung der Pupille eintreten. Eine pupillenverengernde Wirkung, Myosis, oder erweiternde Wirkung, Mydriasis, besitzen Physostigmin, Arecolin bzw. Atropin, Hyoscyamin, Scopolamin, Cocain und zum Teil seine künstlichen Ersatzmittel.

Bringt man eine Spur des Auszuges, der evtl. vorher zu konzentrieren ist, auf die Zungenspitze, so kann Gefühllosigkeit hervorgerufen werden, wenn Cocain oder seine synthetischen Ersatzmittel vorlagen.

Hämolytisch wirkende Gifte werden in der Weise nachgewiesen, daß man ungefähr 1 ccm einer 1% igen Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen in physiologischer Natriumchloridlösung zu etwa 0,5 ccm des wäßrigen Auszuges gibt. Der Auszug ist vorher zu neutralisieren und, um zu vermeiden, daß eine Hämolyse der Blutkörperchen durch die wäßrige Lösung des Auszuges selbst hervorgerufen wird, soviel Natriumchlorid zuzusetzen, wie einer physiologischen (8% igen) Natriumchloridlösung entsprechen würde.

Tritt Hämolyse ein, entsteht also eine Rotfärbung der Flüssigkeit, so können Saponine, Digitalisglucoside, Solanin oder Convallamarin vorliegen. Aus Leichenteilen mit ausgezogenes Cholesterin, das diese Stoffe bindet, kann die Hämolyse verzögern oder auch ganz aufheben.

## 6. Verarbeitung und Untersuchung des alkoholischen Auszuges.

### a) Ätherausschüttelung in saurer wäßriger Lösung.

Die gereinigte wäßrige Lösung des sauren alkoholischen Auszuges (S. 1321) wird nunmehr nach STAS-OTTO<sup>1</sup> mit etwa 100 ccm Äther im Scheidetrichter mehrmals ausgeschüttelt. An Stelle der Ausschüttelung kann man sich auch der Perforation mit Äther bedienen. Als Perforatoren sind die von PARTHEIL, KATZ u. a. im Gebrauch. Meist wendet man die Perforation dann an, wenn es sich um einen in Äther schwer löslichen Körper handelt.

Die gesammelten ätherischen Auszüge schüttelt man zweimal mit etwa 10—15 ccm Wasser aus, zieht die wäßrige Schicht ab, läßt den Äther sich klären, was meist in etwa 2 Stunden erreicht ist, und filtriert durch ein trockenes Filter. Alsdann destilliert man den Äther bei gelinder Wärme auf etwa 25 ccm ab und verdampft letzteren in der Weise, daß man ein kleines Uhrschälchen auf ein warmes Wasserbad stellt und aus einem Scheidetrichter Tropfen für Tropfen je nach der Verdunstungsschnelligkeit zutropfen läßt. Auch wenn die Leichenteile oder Speisereste keine Gifte enthalten, so verbleibt immer noch ein geringer Rückstand, der aus Spuren Weinsäure, Fleischmilchsäure, färbenden Substanzen, Fett und harzartigen Bestandteilen bestehen kann.

Man unterwirft den Rückstand einer genauen Sinnenprüfung. Wenn mit unbewaffnetem Auge keine Krystalle zu erkennen sind, so durchsucht man den Rückstand vermittels des Mikroskopes. Handelt es sich um Arzneimittel, so findet man wohl meist noch solche Mengen vor, daß sie krystalline Konglomerate bilden, die nach weiterer Reinigung nicht zu unschwer zu identifizieren sind. Ist jedoch die Menge gering, so ist die Reinigung des Rückstandes erschwert. Ölige Rückstände krystallisieren erst nach einiger Zeit oder auch dann, wenn man sie mit einem scharfen Glasstab reibt und alsdann noch einige Zeit

<sup>1</sup> STAS: Ann. Chem. u. Pharm. 1852, 84, 379.

im Eisschrank stehen läßt. Ausgeschiedene Krystalle können auf ein Tonscheibchen gestrichen werden, wo man sie mit einem Tropfen eines Lösungsmittels, in dem die Krystalle selbst unlöslich bzw. schwer löslich sind, befeuchtet. Die Verunreinigungen werden hierdurch in die Tonscheibe eingesogen.

Eine Spur des Rückstandes kann man auch auf die Zungenspitze bringen und etwaig auftretende Erscheinungen beobachten. Ein bitterer Geschmack kann von Colchicin, Pikrotoxin oder Pikrinsäure herrühren, auch Veronal und viele andere Arzneimittel schmecken bitter (Nachweis s. S. 1330 u. 1366).

### b) Ätherausschüttelung in alkalischer wäßriger Lösung.

Die mit Äther ausgeschüttelte saure wäßrige Lösung wird mit verd. Natronlauge stark alkalisch gemacht und nun erneut mit Äther ausgeschüttelt. Die Ausschüttelung wird zwei- bis dreimal wiederholt und die vereinigten Auszüge, wie schon bei der sauren Ausschüttelung beschrieben, weiter behandelt. Die in einem Uhrglas zurückbleibenden Stoffe werden nun der Sinnenprüfung, wie auf S. 1326 ausgeführt, unterworfen.

Es können die Abdampfungsrückstände ölige Tropfen bilden und einen typischen Geruch besitzen, der von Anilin, Nicotin oder Coniin herrührt. Auch können die öligen Tropfen später erstarren; dann zeigen sie unter dem Mikroskop häufig kristalline Struktur. Auch gut ausgebildete Krystalle können auf dem Uhrglas zurückbleiben. Auf jeden Fall muß man eine Geschmacksprobe auf der Zungenspitze vornehmen.

Ist der Geschmack stark bitter, so kann Strychnin oder Brucin vorliegen. Chinin besitzt einen typisch bitteren Geschmack. Wird die Zungenspitze unempfindlich, so kann Cocain oder eines der synthetischen Cocainersatzmittel vorliegen. Auch muß auf die Färbung des Rückstandes geachtet werden.

Die auf S. 1327 gemachten Angaben bezüglich der Vorprobenuntersuchung und des physiologischen Tierversuches finden auch hier Anwendung. Die ätherische Lösung der alkalischen Ausschüttelung enthält außer vielen Arzneimitteln, wie z. B. Phenylhydrazin, Paraphenylendiamin, Antipyrin und seinen Ersatzmitteln, Pyramidon, Thallin, Chinolin, Piperazin, Lysidin, fast alle Alkaloide, wie: Coniin, Nicotin, Veratrin, Strychnin, Brucin, Atropin, Scopolamin, Cocain und seine Ersatzmittel wie Eucain, Novocain, Anästhesin, Novain, Holocain, ferner Physostigmin, Codein, Narkotin, Papaverin, Hydrastin, Pilocarpin, Gelsemin, Homatropin, Ephedrin, Aconitin, Emetin, Arecolin, Yohimbin, Chinaalkaloide u. a. m.

Auf die Anwesenheit von Alkaloiden prüft man, wie auf S. 1326 beschrieben, vermittels mehrerer der angegebenen Alkaloidreagenzien.

Sind die Ätherverdampfungsrückstände unrein, so reinigt man sie, indem man sie in schwach salzsaurem Wasser löst, einigemal mit wenig Äther ausschüttelt, die salzsauren Salze dann wieder mit Natronlauge zersetzt und die frei gewordenen Alkaloide erneut mit Äther ausschüttelt. Gelingt diese Reinigung nicht, so kann man sich vorteilhaft auch der Mikrosublimation bedienen. Nur reine Stoffe geben einwandfreie Reaktionen.

Da nun namentlich in die Ätherausschüttelung der alkalisch wäßrigen Lösung leicht Ptomaine mit in Lösung gehen können, die viele Eigenschaften der Alkaloide besitzen und Reaktionen aufweisen, die vielfach denen der Alkaloide ähnlich sind und vor allem auch die allgemeinen Reaktionen mit Alkaloidreagenzien geben, so ist Vorsicht geboten. Reich an Ptomainen sind stark faulende Gehirnmassen. Es ist deshalb ratsam, wie schon erwähnt, bei der Verarbeitung der Leichenteile für die Untersuchung auf Alkaloide und Arzneimittel das Gehirn vorerst von der Untersuchung auszuschließen. Bei der oben angegebenen Reinigung der Alkaloide durch Überführen in die salzsauren Salze

und Ausschütteln mit Äther gehen die Ptomaine in den Äther über, während die salzsauren Salze der Alkaloide im Wasser zurückbleiben; hierdurch können die Ptomaine beseitigt werden.

Über die speziellen Reaktionen der in alkalischer Lösung durch Äther ausschüttelbaren Gifte und stark wirkender Arzneistoffe s. unten S. 1339.

### c) Weitere Verarbeitung und Untersuchung der in der alkalischen wäßrigen Lösung noch vorhandenen Gifte.

In natronalkalischer wäßriger Lösung verbleiben noch die Alkaloide des Opiums, Apomorphin, Morphin und Narcein; Spuren Antipyrin, Coffein und Colehicin können sich auch hier noch vorfinden. Um diese Gifte nun zu isolieren, wird folgendermaßen verfahren: Ist die alkalische Lösung rot oder violettrot gefärbt, was die Anwesenheit von Apomorphin anzeigen würde, so wird zunächst mit verd. Salzsäure angesäuert, dann mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. In dem Äther befindet sich jetzt etwa vorhandenes Apomorphin, das als solches (s. unter Apomorphin, S. 1356) nachgewiesen werden kann. Spuren Morphin gehen auch in den Äther über.

Wenn Apomorphin nicht zugegen ist, so wird die wäßrige, salzsauer gemachte Lösung mit Natriumbicarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt und sofort mit heißem Chloroform etwa vorhandenes Morphin und Narcein ausgeschüttelt. Bei Gegenwart von Apomorphin kann man Morphin und Narcein auch nach der Ausschüttelung des Apomorphins mit Äther isolieren, indem man die ammoniakalische Lösung mit heißem Chloroform auszieht.

Sind die Verdampfungsrückstände des Chloroforms und Äthers nicht rein, so kann eine weitere Reinigung durch Lösen in salzsäurehaltigem Wasser und Ausschütteln mit frisch destilliertem Amylalkohol vorgenommen werden, der die Verunreinigung aufnimmt.

Eine weitere Reinigung kann, wenn nötig, durch Mikrosublimation bewirkt werden.

Quaternäre Basen lassen sich nur aus dem mit Seesand eingetrockneten alkoholischen Auszug mit Alkohol extrahieren.

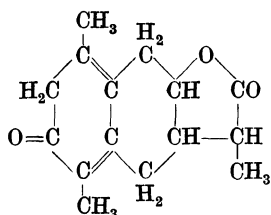
Über die Reaktionen der isolierten Alkaloide s. S. 1364.

## II. Nachweis der einzelnen Gifte.

### A. Aus saurer Lösung ausschüttelbare Gifte.

#### a) Bitterstoffe, Purgativa, Drastica.

1. **Santonin.** Dieser in dem Wurmsamen, *Artemisia maritima*, vorkommende Bitterstoff ist ein Lacton von der Formel  $C_{15}H_{18}O_3$  und nebenstehender Konstitutionsformel:



Durch ätzende Alkalien bildet sich das Salz der Santoninsäure. Bei Vergiftungen tritt Gelb- bzw. Violettsehen ein. Der Harn ist gelb gefärbt und dreht das polarisierte Licht nach links. In den Harn scheint auch chemisch verändertes Santonin überzugehen, durch Alkalien wird er rot gefärbt. Die Rotfärbung kann von Amylalkohol und Chloroform aufgenommen werden.

Das Santonin bildet weiße glänzende Blättchen, die farblos und geruchlos sind und stark bitter schmecken.

Am Licht nehmen sie eine Gelbfärbung an. Santonin ist in Wasser fast unlöslich, dagegen leicht löslich in heißem Wasser, Alkohol, Äther usw.

Schmelzpunkt = 170°. Spez. Gewicht (21°) 1,247. Es sublimiert unzersetzt.

Nachweis. Wenn auch nach dem STAS-OTTOSCHEN Ausschüttelungsverfahren das Santonin in den Äther übergeht, so verfährt man zur Isolierung bei Leichenteilen und Zubereitungen doch in folgender Weise: Man säuert mit Weinsäure schwach an und zieht am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol aus. Der heiß abfiltrierte alkoholische Auszug wird auf dem Wasserbade eingeeengt, der Rückstand in heißem Wasser gelöst und mit Tierkohle auf dem Wasserbade unter häufigerem Umschütteln entfärbt. Alsdann filtriert man heiß von der Kohle ab. Meist scheiden sich schon, sofern Santonin vorhanden ist, Krystalle ab. Geringe Mengen kann man aus der wäßrigen Lösung durch Chloroform ausschütteln. Die geklärte Chloroformschicht wird durch ein trockenes Filter gegossen und eingeeengt. Die erhaltenen Krystalle werden der Bestimmung des Schmelzpunktes, des Brechungsindex usw. unterzogen. Man kann auch nach DRAGENDORFF die Objekte mit kalkmilchhaltigem Wasser einige Stunden der Digestion auf dem Wasserbade unterwerfen. Das Filtrat wird zur Entfernung von Verunreinigungen zuerst mit Benzol und nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit Chloroform ausgeschüttelt und wie oben weiter behandelt. Besser ist es, das Filtrat mit der dreifachen Menge Alkohol zur Ausfällung der Verunreinigungen zu verdünnen und nach Abdestillieren des Alkohols weiter zu verarbeiten.

Reaktionen auf Santonin. 1. Erwärmt man Santonin mit alkoholischer Kalilauge, so tritt eine Rotfärbung auf, die zuerst in Rotgelb, Gelb und dann zuletzt in Farblos übergeht.

2. Man trägt gepulvertes Santonin in eine kalte Mischung aus gleichen Teilen Schwefelsäure und Wasser ein. Wird alsdann dieses Gemisch bis fast zum Sieden erhitzt, so bleibt die Mischung farblos. Auf Zusatz von einigen Tropfen Eisenchlorid tritt eine Violettfärbung ein.

3. Werden einige Tropfen alkoholischer Santoninlösung mit einigen Tropfen einer alkoholischen 2%igen Furfurolösung und 2 ccm konz. Schwefelsäure in einer Porzellanschale erwärmt, so tritt eine purpurrote Färbung ein, die bei weiterem Erhitzen in Carminrot und schließlich in Dunkelblau übergeht.

4. Wird gepulvertes Cyankalium mit gepulvertem Santonin gemischt und erwärmt, so entsteht eine dunkelrote Masse, die in Wasser, auch nach Zusatz von Alkali, eine stark grün fluoreszierende Lösung gibt.

Bestimmung. Durch Wägung des gereinigten ätherischen Rückstandes kann die ungefähre Menge des Santonins festgestellt werden.

2. **Pikrotoxin.** In den Kockelskörnern, Früchten von der Größe des Pfeffers, befindet sich ein betäubendes Gift, Pikrotoxin, von stark bitterem Geschmack, das zum Betäuben der Fische verwendet wird und ein unerlaubtes Fischfangmittel ist. Auch soll es früher bisweilen als Bitterstoff zum Bier, um einen höheren Hopfengehalt vorzutäuschen, zugesetzt worden sein. Pikrotoxin geht unverändert in den Harn über. Es ist in ammoniakalischem Wasser leicht löslich unter Bildung salzartiger Verbindungen.

Pikrotoxin,  $C_{30}H_{34}O_{13}$ , bildet lange weiße Nadeln und spaltet sich leicht in siedendem Benzol oder Chloroform in das giftige Pikrotoxinin,  $C_{15}H_{16}O_6$ , und das ungiftige Pikrotoxin  $C_{15}H_{18}O_7$ . In wäßriger Lösung vereinigen sich beide Körper wieder zu Pikrotoxin. Das Pikrotoxin ist leicht löslich in vielen Lösungsmitteln. Mit Brom verbindet es sich zu Brompikrotoxinin. Schmelzpunkte: Pikrotoxin 199—200°, Pikrotoxin 248—250°, Pikrotoxinin 200—201°, Brompikrotoxinin 259° ( $\alpha$  und  $\beta$ ).

Nachweis. Pikrotoxin läßt sich aus saurer, wäßriger Lösung mit Äther oder Chloroform ausschütteln. Sollte der Rückstand noch verunreinigt sein, so kann man ihn in Wasser lösen und durch Zusatz von Bleiessig reinigen. In dem Filtrat wird das überschüssige Blei durch Schwefelwasserstoff gefällt und die Lösung eingedampft. In Leichenteilen, die in stärkere Fäulnis übergegangen sind, läßt sich Pikrotoxin nicht mehr nachweisen.

Reaktionen. 1. Pikrotoxin reduziert FEHLINGSche Lösung. Man löst einige Kryställchen in einigen Tropfen verd. Natronlauge und erwärmt langsam mit einigen Tropfen FEHLINGScher Lösung. Es trübt sich die Mischung und scheidet einen gelbroten bis roten Niederschlag aus.

2. Ammoniakalische Silberlösung wird beim Kochen mit etwas Pikrotoxin reduziert.

3. Bringt man eine Spur Pikrotoxin in 1—2 Tropfen einer Mischung von Benzaldehyd und Alkohol (1:1) und fügt einen Tropfen konz. Schwefelsäure hinzu, so tritt eine Rotfärbung ein. Nimmt man die Reaktion in einem Porzellanschälchen vor, so sieht man beim Hin- und Herbewegen von den Pikrotoxinkristallen sich rote Streifen in die Flüssigkeit ziehen. Auch diese Reaktion ist, ebenso wie die beiden ersten Reaktionen, nicht eindeutig; Veratrin und Morphin geben ähnliche Reaktionen.

4. Mischt man nach LANGLEY Pikrotoxin mit der dreifachen Menge Salpeter und fügt eine Spur konz. Schwefelsäure und alsdann konz. Natronlauge zu, so tritt eine intensive Rotfärbung ein.

Durch einen physiologischen Versuch kann der chemische Befund noch gestützt werden. Wird in ein etwa  $\frac{1}{2}$  Liter enthaltendes Gefäß ein kleiner Fisch gebracht, so zeigt dieser auf Zusatz von einigen Milligrammen Pikrotoxin, je nach seiner Größe und der zugesetzten Menge Pikrotoxin, nach einiger Zeit ein unruhiges Wesen und nach etwa 10—24 Stunden durch Querlage und darauffolgenden Tod die Einwirkung des Giftes an. Wichtig ist es, den Versuch zu wiederholen und während der Dauer des Versuchs Luft durch das Wasser zu leiten.

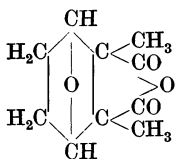
Auch hämolytische Eigenschaften zeigt Pikrotoxin. Ausführung des hämolytischen Versuches s. S. 1336.

3. *Cicuta virosa*. Das Gift des Wasserschierlings ist nicht bekannt. Es soll nach BÖHM ein harzartiger Körper sein, das Cicutoxin. Ferner enthält die Wurzel des Wasserschierlings noch Umbelliferon, ein Oxycumarin,  $C_9H_6O_3$ , das in Wasser unter blauer Fluoreszenz löslich ist. Den Nachweis kann man mit Sicherheit nur erbringen, wenn es gelingt, Fragmente der Pflanze im Magen oder Darm zu finden. Der alkoholische Auszug wird, nachdem der Alkohol verjagt ist, in Wasser aufgenommen und durch Äther der Giftstoff ausgeschüttelt. Das isolierte Gift muß einer physiologischen Untersuchung unterworfen werden.

4. *Cantharidin*. Es ist die wirksame Substanz der spanischen Fliege, *Lytta vesicatoria*. Der Gehalt an Cantharidin kann bis zu 2% betragen. Das Cantharidin ruft auf der Haut Blasenbildung hervor. Nach GADAMER kommt ihm die nebenstehende Formel zu; es ist das Anhydrid der Cantharidinsäure, die mit Alkalien in Wasser lösliche Salze gibt. In Wasser ist Cantharidin sehr schwer löslich, Chloroform, Aceton und Essigäther lösen es leichter. Schmelzpunkt =  $218^{\circ}$ . Es bildet unzersetzte Sublimate.

a) Nachweis. Wenn spanische Fliegen als solche eingenommen worden sind, so kann man im Magen- und Darminhalt (Erbrochenem) leicht bläulich glitzernde Fragmente der Flügeldecken auffinden, die alsdann mikroskopisch identifiziert werden können. Andernfalls werden die fraglichen Objekte mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und längere Zeit erwärmt. Die klare Flüssigkeit wird zur Entfernung störender Substanzen mit Chloroform ausgeschüttelt und die Lösung mit Schwefelsäure angesäuert, mit der vierfachen Menge Alkohol versetzt und durch längeres Kochen am Rückflußkühler die Cantharidinsäure in Cantharidin zurückverwandelt. Das Filtrat wird alsdann mit Natronlauge ganz schwach alkalisch gemacht, der Alkohol auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand nach dem Ansäuern mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Verdunstungsrückstand enthält das Cantharidin, das leicht durch Sublimation, wenn nötig, weiter gereinigt werden kann.

Nach DRAGENDORFF läßt sich Cantharidin auch durch schwefelsäurehaltigen Alkohol ausziehen. Besser zieht man es nach MARCHIOLO mit konz. Ameisensäure



aus. Man erwärmt die Substanz mit der dreifachen Menge konz. Ameisensäure am Rückflußkühler auf etwa 50—60° und fügt nach  $\frac{1}{2}$  Stunde das gleiche Volum Wasser, also die vierfache Menge, zu und läßt noch 24 Stunden unter häufigem Schütteln die Mischung stehen. Die Mischung wird abgenutscht und die Flüssigkeit auf dem Wasserbade eingeeengt. Zur Zerstörung des Fettes wird der Rückstand mit 20—30 g konz. Schwefelsäure versetzt und solange auf dem Wasserbade erwärmt, bis die Einwirkung, Verkohlung, beendet ist. Nach Zusatz von Wasser wird der Lösung durch Chloroform das Cantharidin entzogen. Weitere Isolierung s. oben.

Da chemische Reaktionen fehlen, kann neben der Schmelzpunktbestimmung ein physiologischer Versuch durchgeführt werden. Etwas von dem Rückstand wird in einem Tropfen Öl gelöst, ein Leinenstückchen damit befeuchtet und dieses auf dem Oberarm befestigt. Es tritt nach einiger Zeit Rötung der Haut und auch wohl Pustelbildung ein.

**5. Coloquinten.** Der wirksame Stoff der Coloquinten, einer Frucht, deren Mark die größte Mengen davon enthält, ist ein Glucosid, das Colocynthin, welches durch Säuren in wasserunlösliches Colocynthein und Elaterin gespalten wird. Das Colocynthein läßt sich in Leichen, da es im Gegensatz zum Colocynthin ziemlich beständig ist, nachweisen. Das Colocynthein ist in Wasser und Alkohol leicht löslich und läßt sich aus wäßrigen Lösungen, die mit Ammoniumsulfat gesättigt sind, mit alkoholischem Chloroform, 10% Alkohol, ausschütteln.

Reaktionen. FRÖHDES Reagens färbt Colocynthin kirschrot und Colocynthein allmählich schmutzigrot.

MANDELINS Reagens färbt Colocynthin tiefrot und Colocynthein blau, größere Menge rot.

Konz. Schwefelsäure löst beide Körper mit leuchtend gelbroter Farbe auf, die allmählich braun wird.

**6. Gummigutt.** Das Gummigutt ist ein gelbes Harz, das aus der angeschnittenen Rinde des Gummiguttibaumes herausquillt. Es findet als Malerfarbe Anwendung. Mit Wasser gibt Gummigutt eine gelbe Emulsion, die durch Zusatz von Alkalien unter blutroter Färbung sich löst. Der wirksame, giftige Stoff ist die Cambogiasäure; sie kann durch Äther aus der Emulsion in Wasser ausgeschüttelt werden.

Reaktionen. Eisenchloridlösung färbt die alkalische Lösung von Gummigutt schwarzgrün.

Bleiaacetatlösung gibt mit der durch Alkalizusatz rot gefärbten Lösung einen gelben Niederschlag.

## h) Glucoside.

Zur Gruppe der Glucoside zählen Körper mit Säure- oder Phenolcharakter, die esterartig mit Zuckerarten, meist Glucose, Galaktose, oder auch Mannose, Rhamnose usw., unter Austritt von Wasser verbunden sind. Die meisten Glucoside zeigen in wäßriger Lösung neutrale oder schwach saure Reaktion und sind meist krystallisierbar. Schon durch verdünnte Säure tritt unter Aufnahme von Wasser eine Spaltung in ihre Komponenten ein. Vielfach ist die Bindung so fest, daß längeres Erwärmen mit Säuren erst die Spaltung bewirkt, die auch dann noch unvollkommen ist. Die in den Pflanzenzellen vorhandenen Fermente spalten dagegen bei Gegenwart von Wasser die Glucoside vollkommen, s. Blausäure S. 1290 und Zucker. Mit Tannin und Phosphormolybdänsäure geben einige Glucoside Niederschläge.

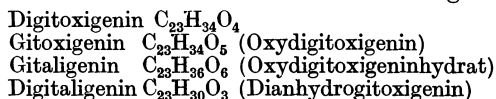
Als allgemeine Reaktion auf Glucoside dient die BRUNNER-PETTENKOFERSche Gallenreaktion: Fügt man zu der wäßrigen Lösung des Glucosids ein Körnchen Ochsen-galle und unterschichtet nach dem Lösen der Ochsen-galle die Mischung mit dem gleichen Volum konz. Schwefelsäure, so entsteht an der Berührungsschicht ein blauroter Ring, der nach dem Umschwenken der ganzen

Flüssigkeit eine rote Färbung verleiht. Diese Reaktion ist jedoch, sofern noch Zucker vorhanden ist, nicht eindeutig.

Zur Gewinnung und Reinigung der Glucoside kann die Fällung durch Tannin oder durch Adsorption mit Tierkohle gute Dienste leisten. Durch Ausziehen der Niederschläge mit Alkohol kann dann das Glucosid, falls es krystallisiert, durch Krystallisation gereinigt und zwecks Nachweis physiologischen Untersuchungen unterworfen werden.

**1. Digitalisglucoside.** In den Samen und Blättern des roten Fingerhutes (*Digitalis purpurea*) sind auf das Herz stark giftig wirkende Glucoside enthalten, von denen das Digitoxin vorwiegt.

Die Glycoside des Fingerhutes gehören zu den Oxy-lactonen. Zwischen den Glucosiden der Samen und Blätter besteht kaum ein Unterschied. Man kann nach H. RUNNE<sup>1</sup> alle zuckerfreien Spaltungsprodukte der Digitalisglucoside auf das Digitoxigenin zurückführen und als Derivate des Digitoxins bezeichnen.



Es seien folgende wichtigere Glucoside und ihre Spaltungsprodukte noch aufgeführt:

Digitoxin spaltet sich in Digitoxigenin und Digitoxose.

Digitalin spaltet sich in Digitaligenin, Glucose und Digitalose.

Digitonin spaltet sich in Digitogenin und Glucose und Galactose.

a) Digitonin ( $C_{55}H_{90}O_{29} + 10 H_2O$ ) wird zu den Saponinen gezählt. Es krystallisiert aus Alkohol in feinen Nadeln, verd. Salzsäure spaltet Digitonin in Digitogenin, Galaktose und Glucose. Das Digitonin besitzt giftige Eigenschaften; es ist aber kein Herzgift im Gegensatz zu Digitalin und Digitoxin. Bei  $235^{\circ}$  sintert Digitonin und wird unter Gelbfärbung weich.

Reaktionen. 1. Mit konz. Schwefelsäure entsteht eine auf Zusatz von wenig Bromwasser intensiver werdende Rotfärbung.

2. Mischt man eine alkoholische Lösung von Digitonin mit einer alkoholischen Lösung von Cholesterin, so scheiden sich feine Nadeln einer Digitonin-Cholesterin-Doppelverbindung aus.

b) Digitalin (*Digitalinum verum*)  $C_{35}H_{56}O_{14}$  findet sich in den Samen und in Spuren in den Blättern, hat stark giftige Eigenschaften. Durch Kochen mit verd. Säuren findet eine Spaltung in Digitaligenin, Glucose und Digitalose, eine Zuckerart, statt. Das Digitalin ist schwer löslich in Wasser, leicht löslich dagegen in Alkohol und fast unlöslich in Äther und Chloroform. Es besitzt einen schwach bitteren Geschmack. Schmelzpunkt  $214^{\circ}$ ; bei  $210^{\circ}$  tritt Sinterung ein.

Reaktionen. Nach KILLANI gibt Digitalin mit arsenhaltiger Schwefelsäure eine kirschrot bis blaurote Färbung, die allmählich in eine beständige Violettfärbung übergeht.

c) Digitoxin ( $C_{44}H_{70}O_{14}$ ) findet sich fast ausnahmslos in den Blättern. Es ist sehr stark giftig und krystallisiert aus Alkohol in weißen Blättchen. Äther und Wasser lösen es kaum. Aus der Lösung in Alkohol oder Chloroform wird durch Zusatz von Äther das Digitoxin in Digitoxigenin und Digitoxose gespalten. Der Schmelzpunkt des aus verd. Alkohol umkrystallisierten Digitoxins liegt bei  $145^{\circ}$ . In Chloroform oder Methylalkohol gelöst und daraus durch Äther ausgefällt, zeigt das gereinigte Digitoxin den Schmelzpunkt  $252^{\circ}$ .

Nachweis. Da die Fragmente der Digitalispflanze (Blätter und Samen) leicht mikroskopisch erkannt werden können, so fahndet man im Magen- und Darminhalt sowie Erbrochenem nach diesen Fragmenten. Von den drei benannten Glucosiden verschwinden im Organismus das Digitonin und Digitalin sowie ihre Spaltungsprodukte völlig. Mithin richtet sich die Ausmittlung lediglich auf das Digitoxin. Mageninhalt und zerkleinerte Leichenteile säuert

<sup>1</sup> H. RUNNE: Pharm. Zentralh. 1929, 70, 453.

man nach CLOËTTA<sup>1</sup> mit Essigsäure schwach an und versetzt die Mischung mit 50%igem Alkohol. Das Gemisch erwärmt man auf dem Wasserbade und filtriert oder koliert nach einigen Stunden von dem Ungelösten ab. Den Auszug engt man auf dem Wasserbade ein und verrührt den Rückstand unter allmählichem Zusatz von absol. Alkohol bis keine Fällung von Eiweißstoffen usw. mehr auftritt. Das Filtrat wird eingeeengt und in 10%igem Alkohol gelöst, dem man sehr wenig Ammoniak zugefügt hat. Diese Lösung wird mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt, der Verdunstungsrückstand zwecks Reinigung in einigen Kubikzentimetern Chloroform gelöst und nach Zusatz von 10 ccm Äther und 70 ccm Petroläther einige Tage stehen gelassen. Es scheidet sich Digitoxin aus, das gesammelt und identifiziert werden kann.

Bei Harn kann man in der Weise verfahren, daß man ihn schwach alkalisch macht und bis zum Sirup verdampft. Den Rückstand knetet man mit der etwa fünffachen Menge absol. Alkohol durch und gibt alsdann der Alkoholmenge entsprechende gleiche Mengen Chloroform und Benzol zu. Die dunkelbraune Lösung versetzt man mit Bleiessig unter kräftigem Umschütteln, bis die überstehende Flüssigkeit hellgelb erscheint. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit einer Mischung von 5 Tln. Alkohol und je 1 Tl. Chloroform und Benzol ausgewaschen. Das Filtrat wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff von Blei befreit und zum Sirup eingeeengt. Der Rückstand wird wiederum mit Alkohol, dem man wenig Ammoniak zugesetzt hat, aufgenommen und mit einer Benzol-Chloroformmischung (1:3) ausgeschüttelt. Durch Filtration über Kieselgur, mit dem die Flüssigkeit angeschüttelt wird, kann man die noch vorhandenen färbenden Stoffe entfernen.

Die klare Lösung wird eingeeengt und kann zum näheren Nachweis dienen.

Reaktionen. 1. Gallenreaktion nach PETTENKOFER und BRUNNER s. unter Glucoside, S. 1333.

2. Eine Spur des isolierten Digitoxins wird in etwa 3 ccm Eisessig gelöst, der etwas Eisen enthält (100 ccm Eisessig + 1 ccm 5% Ferrisulfatlösung). Unter diese Lösung schichtet man einige Kubikzentimeter konz. Schwefelsäure, welche die gleiche Menge Ferrisulfatlösung wie der Eisessig enthält. Die Berührungsschicht zeigt bei Anwesenheit von Digitoxin einen dunklen Ring, der blau und nach längerem Stehen die ganze Eisessiglösung tief blau färbt.

Diese und andere Reaktionen sind jedoch nicht typisch. Es ist am zweckmäßigsten, mit dem isolierten Glucosid physiologische Versuche am überlebenden Froschherz anzustellen. Auch kann man den Befund quantitativ deuten.

2. **Strophantin.** Glucosidartige Stoffe, die auch zu den Herzgiften zählen, sind in den Samen verschiedener *Strophantus*arten enthalten. Diese Glycoside sind unter sich chemisch verschieden, wenn ihnen auch die gleiche oder ähnliche Wirkung zukommt. Durch Hydrolyse werden die Strophantine in Zucker, Rhamnose oder Mannose und Strophantidine gespalten.

a) **Nachweis.** In dem Magen- oder Darminhalt und in Erbrochenem kann man nach Fragmenten der Samen fahnden. Die Fragmente werden durch Betupfen mit Schwefelsäure grün, wenn sie glucosidarm sind, rot gefärbt. Um die Objekte auszuziehen, verwendet man alkalischen Alkohol. Den Verdampfungsrückstand nimmt man mit Wasser auf. Die wäßrige Lösung wird zur Entfettung mit Äther ausgeschüttelt, dann durch Zusatz von Bleiessig entfärbt, das Filtrat durch Schwefelwasserstoff entbleit und das Filtrat vom Bleisulfidniederschlag bis zur Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Es scheidet sich alsdann vorhandenes Strophantin ab, das gesammelt, in Alkohol gelöst und durch Äther gefällt wird. Nachdem durch das Lösen in Alkohol

<sup>1</sup> CLOËTTA: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 1906, 54, 294.



und Fällen mit Äther eine weitere Reinigung erfolgt ist, kann mit dem Rückstand der chemische Nachweis angetreten werden.

b) Reaktionen. 1. Gallenreaktion nach PETTENKOFER und BRUNNER, s. S. 1333.

2. Wird eine geringe Menge des isolierten Stoffes in einem Tropfen Wasser gelöst, mit einer geringen Menge Eisenchlorid und einigen Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt, so tritt bei Anwesenheit von Strophantin ein rotbrauner Niederschlag auf, der nach einiger Zeit sich intensiv grün färbt.

3. Der physiologische Versuch wird am überlebenden Froschherzen ausgeführt.

3. **Neriin.** Der Oleander (*Nerium Oleander*) enthält in allen seinen Teilen giftige Glucoside verschiedener Art, die ebenfalls Digitaliswirkung besitzen. Die Isolierung kann nach der allgemeinen Ausmittlung der Glucoside, s. S. 1333, erfolgen.

Die chemischen Reaktionen sind wie bei allen Glucosiden nicht eindeutig.

4. **Scilla-Glucoside.** Die Blätter des zu den Liliaceen gehörenden Zwiebelgewächses *Scilla maritima* enthalten keine einheitlichen Giftkörper. Die Scilla-Glucoside besitzen ebenfalls Digitaliswirkung.

### c) Saponine und saponinähnliche Körper.

In sehr vielen Pflanzen finden sich Stoffe, Saponine genannt, vor, die glykosidischer Natur sind und bei der Hydrolyse durch verd. Säuren in Zucker, Pentosen oder Hexosen und sog. Sapogenine, die in Wasser unlöslich sind, zerfallen. Durch die Aufspaltung in Zucker können die Saponine zum Teil durch FEHLINGSche Lösung reduziert werden. Ihnen allen ist gemeinsam, daß sie stickstofffrei sind, mit Ausnahme des Solanins, und in wäßriger Lösung stark schäumen. Werden Saponine in die Blutbahn gebracht, so üben sie eine starke Giftwirkung aus, da sie die roten Blutkörperchen auflösen, also hämolytisch wirken, während sie eingenommen, keine oder nur geringe darmreizende Eigenschaften besitzen. Ihr Geschmack ist kratzend, bitter. In Wasser sind sie wahrscheinlich kolloidal löslich.

Über die chemische Zusammensetzung ist noch wenig bekannt. Die Saponine sind unter sich nicht identisch. In der Technik wird die saponinhaltige Quillajarinde als Waschmittel benützt. Andere saponinhaltige Pflanzenteile werden als Heilmittel angewendet, z. B. die Senegawurzel.

Folgende Saponine finden sich in Pflanzen vor:

Digitonin im Fingerhut, Githagin im Samen der Kornrade, Senegin in der Senegawurzel, Sapotoxin in der Quillajarinde, Cyclamin in dem Wurzelstock von *Cyclamen europaeum*. Die Isolierung der Saponine, die aus Leichenteilen, Mageninhalt, Erbrochenem usw. wenig Erfolg verspricht, kann in der Weise durchgeführt werden, daß die mit Magnesiumcarbonat neutralisierte Masse mit Alkohol ausgekocht wird. Das alkoholische Filtrat wird durch Erwärmen auf dem Wasserbade von Alkohol befreit und der wäßrige Rückstand zur Entfernung des Fettes mit Äther ausgeschüttelt. Aus dieser Lösung werden neutrale Saponine mit Bleiessig oder Bleiacetat, saure Saponine mit Bariumhydroxyd gefällt. Die ausgewaschenen Niederschläge werden durch Schwefelwasserstoff oder Kohlensäure zerlegt und das Filtrat auf dem Wasserbade eingeeengt. Aus der wäßrigen konz. Lösung kann das Saponin durch Aussalzen oder Zusatz von Alkohol und Äther ausgeschieden oder auch nach Zusatz von Ammoniumsulfat durch Amylalkohol, Isobutylalkohol oder Amylalkohol ausgeschüttelt werden. Durch Lösen des gefällten oder ausgeschüttelten Saponins in Alkohol und erneutes Fällen mit Äther kann es weiter gereinigt werden.

Nachweis. 1. Hämolyse. Die Saponine haben die Eigenschaft, rote Blutkörperchen zu lösen. Zur Ausführung der Hämolyse wird frisches Blut, Hammel- oder Rinderblut, in einem dickwandigen Glasgefäß, das steril ist und in dem sich sterile Glasperlen befinden, steril aufgefangen. Durch Schütteln

scheidet sich an den Glasperlen das Blutfibrin ab. Die trübe Blutlösung, die nun nicht mehr gerinnt, wird zentrifugiert, am besten in kleinen sterilen Zentrifugengläschen, die mit einer sterilen Gummikappe versehen sind. Das überstehende Serum wird abgegossen, und das Gläschen mit steriler physiologischer Natriumchloridlösung, 9,0 g Natriumchlorid in 1 Liter Wasser gelöst, gefüllt und kräftig geschüttelt. Alsdann werden die Blutkörperchen abzentrifugiert; diese Manipulation ist mehrmals zu wiederholen. Die nun mit physiologischer Natriumchloridlösung aufgefüllten Zentrifugengläschen werden gut geschüttelt, damit man eine gleichmäßige Blutkörperchenaufschwemmung erhält, die direkt benutzbar ist.

Die isolierte Saponinlösung wird mit soviel Natriumchlorid versetzt, daß eine 0,9% ige Lösung entsteht. Man nimmt etwa den  $\frac{1}{100}$  Teil der Lösung und fügt in einem Reagensglas noch soviel Natriumchloridlösung hinzu, daß die Lösung etwa 2 ccm beträgt und gibt alsdann noch etwa 2 ccm der auf 1% herabgesetzten Blutkörperchenaufschwemmung hinzu. Tritt nach kurzer Zeit eine Rotfärbung der Flüssigkeit ein, so ist ein Stoff, Saponin, vorhanden, der Hämolyse bewirkt.

Um sicher zu sein, daß diese Hämolyse durch Saponin hervorgerufen worden ist, macht man sich die Beobachtung zunutze, daß die Saponine durch Cholesterin abgefangen bzw. chemisch gebunden werden und verfährt nach RANSOM in der Weise, daß die fragliche, natriumchloridhaltige Lösung mit soviel einer in Äther gelösten Cholesterinlösung durchschüttelt wird, daß auf 20 Tln. Saponin etwa 1 Tl. Cholesterin kommt. Diese Lösung wird einige Stunden auf 36° erwärmt, wodurch der Äther, der noch in Wasser gelöst war, sich verflüchtigt. Diese so bereitete Lösung darf keine Hämolyse zeigen.

Die hämolytische Kraft der einzelnen Saponine ist sehr verschieden, z. B. wirkt Digitonin noch in einer Verdünnung 1:80000, Quillajasapotoxin 1:10000, Solanin 1:8300.

Tritt Hämolyse nicht ein, so braucht eine weitere Untersuchung nicht vorgenommen zu werden.

2. Versuch mit lebenden Fischen. Über die Ausführung s. S. 1332. In einer Verdünnung 1:200000 wird ein kleines Fischchen nach 12—24 Stunden typische Vergiftungserscheinungen zeigen.

Über die quantitative Bestimmung der Saponine siehe KOFLER<sup>1</sup>.

Reaktionen. Gallenreaktion nach PETTENKOFER und BRUNNER s. S. 1333.

4. Konz. Schwefelsäure. Durch konz. Schwefelsäure werden die Saponine unter Auftreten roter oder gelbroter Färbung gelöst. Die Färbung geht allmählich in Violett über.

5. FROEHDES Reagens. Durch Vanadinschwefelsäure werden die Saponine unter verschiedener Färbung gelöst. Die Färbungen sind braun, rotbraun, blau, grün und violett.

1. Mutterkorn. In dem Mycel des Mutterkorns (*Claviceps purpurea*), das auf dem Getreidekorn sich entwickelt und ein braunschwarzes, etwa 1—2 cm langes, gebogenes Mycel bildet, befinden sich 5 giftige Bestandteile, die zum Teil zu den Saponinen und zum Teil zu den Alkaloiden gezählt werden. Neben diesen Stoffen kommt auch ein Farbstoff in den peripheren Teilen des Mycels vor, das Sklererythrin, das zur Ausmittelung bei Mutterkornvergiftungen von Wichtigkeit ist. Zu den Alkaloiden zählt man Ergotin,  $C_{35}H_{39}N_5O_5$ , und Hydroergotin,  $C_{35}H_{41}N_5O_6$ , auch wohl Ergotoxin genannt. Der Schmelzpunkt des Ergotins liegt bei 229° und der des Hydroergotins bei 162—164°. Neben Säuren, der Sphazelinensäure und Sklerotinsäure, kommt im Mutterkorn nach KOBERT ein stark giftig wirkendes Herzgift vor, das Sphacelotoxin.

Ergotin und Hydroergotin sind in Wasser und Petroläther fast unlöslich. In Alkohol sind sie mit blauer Fluorescenz löslich. Da die beiden

<sup>1</sup> KOFLER: Z. 1922, 43, 278.

Körper zu den Basen zählen, so können sie aus neutralen oder nur schwach sauren Lösungen durch Benzol oder Chloroform ausgeschüttelt werden.

**Nachweis.** Im Mageninhalt oder Erbrochenen kann man nach Fragmenten des Mutterkorns fahnden. Die isolierten Teilchen, die mikroskopisch ein feinmaschiges Gewebe vorstellen und deren Randpartien stark gefärbt sind, werden mit etwa 60% iger Chloralhydratlösung verrührt und von der Lösung abfiltriert. Bei Anwesenheit von Mutterkornfragmenten wird das chloralhydrathaltige Filtrat hell kirschrot gefärbt. Wird Filtrierpapier mit einem Tropfen der Lösung befeuchtet, so tritt nach dem Trocknen ein hellrötlicher, am Rande brauner Flecken auf, der mit ammoniakhaltigem Alkohol betupft, im Farbenton in Violett umschlägt.

Wenn eine Isolierung von Mycelfragmenten nicht gelingt, so kann man der Masse den Farbstoff des Sklererythrins mit 80% igem Alkohol durch 12stündige Digestion bei 40° entziehen; nach der Filtration wird das Filtrat im Vakuum über Schwefelsäure eingengt. Der Rückstand wird mit alkoholhaltigem saurem Wasser aufgenommen und der Farbstoff mit Äther ausgeschüttelt.

Ist der Äther rötlich gefärbt, so kann man spektralanalytisch den Farbstoff charakterisieren. Hierzu wird der Farbstoff dem Äther durch Ausschüttelung mit etwa 1 ccm kalt gesättigter wäßriger Natriumbicarbonatlösung entzogen und unmittelbar spektralanalytisch untersucht. Das Sklererythrin zeigt dann Absorptionsstreifen, den stärksten rechts von der D-Linie in Gelb, zwei schwächere, von denen einer bei E und der andere rechts von E liegt, und einen dritten bei F und links davon im Grün. Säuert man die Lösung an und schüttelt mit Äther aus, so zeigt der nun den Farbstoff enthaltende Äther zwei Absorptionsstreifen in Grün bei E und F, aber näher an E, und einen zweiten, breiteren Absorptionsstreifen im Blau in der Mitte zwischen F und G.

**2. Solanin.** In Nachtschattengewächsen und in der Kartoffel, die ja zu den Solanaceen gehören, befinden sich giftige Körper, die mehr zu den Saponinen als zu den Alkaloiden zu zählen sind und wie echte Saponine wirken. Solanin enthalten wohl die Früchte und Samen, während in Blättern und jungen Trieben, z. B. den Trieben der Kartoffelknolle, hauptsächlich Solanidin vorkommt. Außer Solanin und Solanidin, das ein Spaltungsprodukt des Solanins ist, kommt noch ein amorpher Körper, das Solanein, vor. Solanin krystallisiert in weißen bitter schmeckenden Nadeln, es ist in Wasser und Äther sehr wenig löslich, leichter in siedendem Alkohol. Die Reaktion ist schwach alkalisch. Durch heißen Amylalkohol kann man aus saurer oder alkalischer Lösung das Solanin ausschütteln. Der Schmelzpunkt liegt bei 244°. Durch 2% ige Säuren, Salzsäure oder Schwefelsäure, wird das Solanin in der Wärme hydrolysiert und in Galaktose, Rhamnose und Solanidin,  $C_{40}H_{61}NO_2$ , gespalten. Aus dem schwefelsauren oder salzsauren Salz kann das Solanidin durch Ammoniak frei gemacht und aus Äther umkrystallisiert werden. Der Schmelzpunkt der seidenglänzenden Krystalle liegt bei 207°.

**Nachweis.** Man zieht die neutralisierten Objekte am besten kalt nach Zusatz von etwas Essigsäure mit Wasser oder Alkohol aus. Die abfiltrierten Auszüge werden mit Magnesiumoxyd neutralisiert und durch Petroläther entfettet. Das Filtrat wird alsdann auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Den Rückstand kocht man mit Alkohol aus und filtriert heiß. Erheblichere Mengen Solanin bedingen eine gallertige Erstarrung des Alkohols in der Kälte. Nach Verdampfen des Alkohols kann man den Rückstand dadurch noch reinigen, daß man ihn in schwach essigsaurem Wasser aufnimmt und das Solanidin mit Äther oder Chloroform ausschüttelt. Mit dem Verdampfungsrückstand werden folgende chemische Reaktionen angestellt:

**Reaktionen.** 1. Selenschwefelsäure: 0,3 g Natriumselenat + 8 ccm Wasser + 6 ccm konz. Schwefelsäure gibt mit einem Körnchen Solanin oder Solanidin eine himbeerrote Farbe. Schärfe der Reaktion 0,025 mg bei Solanin und 0,01 mg bei Solanidin.

2. Vanadinschwefelsäure. Auf Zusatz von Vanadinschwefelsäure färben sich Solanin und Solanidin orange-gelb, die Färbung geht bald in Rot und dann in Blauviolett über.

3. Alkoholschwefelsäure. Solanin und Solanidin lösen sich in einem Gemisch gleicher Volumen konz. Schwefelsäure und absoluten Alkohols unter johannisbeerroter Färbung auf. Schärfe der Reaktion 0,05 mg Solanin und 0,01 mg Solanidin.

4. Dampft man Solanin oder Solanidin mit 1—2 Tropfen sehr verd. Platinchloridlösung ein, so entsteht eine purpurne bis violette Färbung, die beim Abkühlen verschwindet und beim Erwärmen wieder auftritt.

#### d) Purinabkömmlinge.

Im Kaffee, Tee, der Kakaobohne und den Colanüssen kommen reichlichere Mengen von Purinbasen vor, die infolge ihrer Wirkung auf das Herz Vergiftungen hervorrufen können.

In der Kaffeebohne und im Tee findet sich das Coffein (Trimethyldioxy-purin), in der Kakaobohne das Theobromin (Dimethyldioxy-purin). Ferner findet sich im Tee noch das Theophyllin, ein dem Theobromin isomeres Dimethyldioxy-purin.

Verschiedene Arzneimittel, die an anderer Stelle besprochen werden, enthalten Purinabkömmlinge. Bei der Ausmittelung der Gifte nach dem Verfahren von STAS-OTTO findet man diese Körper in der weinsäuren und alkalischen Ätherausschüttelung. Zur quantitativen Ausschüttelung ist Chloroform am besten geeignet.

Verhalten der isolierten Purinkörper. Die Purinkörper besitzen keinen Alkaloidcharakter, sie geben mit Alkaloidreagenzien nur in konz. Lösungen Fällungen. Gerbsäurelösung fällt weiße Doppelverbindungen, die im Überschuß des Fällungsmittels löslich sind. Die Schmelzpunkte sind deshalb nicht genau, weil schon vor dem Schmelzen eine Sublimation stattfindet. Sehr leicht lassen sich die Körper durch Mikrosublimation reinigen. — Schmelzpunkte: Coffein 234°, Theobromin (sublimiert) 290°, Theophyllin 265°.

Verhalten gegen Chlorwasser<sup>1</sup>. Man übergießt Coffein mit der 10fachen, Theobromin und Theophyllin mit der 100fachen Menge Chlorwasser oder Wasserstoffsperoxyd und etwas Salzsäure. Bei Coffein wird langsam, bei den beiden letzteren Verbindungen jedoch schnell auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Wenn man über die rot gefärbten Rückstände ein Uhrglas deckt, in dem sich ein Tropfen Ammoniak befindet, so färbt sich der Rückstand schön rotviolett. Zum näheren Nachweis dienen die Goldchloriddoppelverbindungen.

Coffein läßt sich von Theobromin in der Weise trennen, daß man das trockene Gemisch mit kaltem Tetrachlorkohlenstoff behandelt, in welchem Theobromin unlöslich ist. Aus wäßrig-alkalischer Lösung kann das Coffein mit Chloroform ausgeschüttelt werden, während Theobromin und Theophyllin in saurer wäßriger Lösung nicht in Chloroform übergehen.

Die Bestimmung kann durch Wägung der isolierten Purinabkömmlinge und durch eine Stickstoffbestimmung nach Mikrokjeldahl durchgeführt werden. Näheres über die quantitative Bestimmung der Purinabkömmlinge s. unter Kaffee und Tee, Bd. VI.

## B. Aus alkalischer und ammoniakalischer Lösung ausschüttelbare Gifte (Alkaloide) und die der quaternären Basen.

### a) Allgemeine Eigenschaften der Alkaloide.

Die Alkaloide haben basischen Charakter und bilden mit Mineralsäuren meist gut kristallisierende Salze, die jedoch zuweilen stark hygroskopisch sind.

<sup>1</sup> C. A. ROJAHN u. F. STRUFFMANN: Pharm. Zentralh. 1929, 70, 405.

Mit Platinchloridchlorwasserstoffsäure, Goldchloridchlorwasserstoffsäure, Quecksilberchlorid, Pikrinsäure und anderen mehr bilden sie gut charakterisierte, vielfach schwer lösliche Doppelsalze, die durch Umkrystallisation gereinigt werden können. Mit Jodjodkalium geben sie Perjodide, die man zur Reinigung der Alkaloide ebenso benutzen kann, wie die Metalldoppelsalze, welche letztere zur Isolierung des Alkaloides durch Schwefelwasserstoff zerlegt werden.

Zwei Alkaloide sind flüssig, das Coniin und Nikotin, während die anderen Alkaloide meist feste Körper sind.

Über ihre physiologische Wirkung s. Bd. I, S. 1107.

### b) Quantitative Bestimmung der Alkaloide.

1. Die Alkaloide können nach der Reinigung entweder als freie Base oder als salzsaure Salze auf der Mikrowaage zur Wägung gebracht werden. Da viele Alkaloide und vor allem ihre Salze hygroskopisch sind, so muß man sie im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure trocknen und im Wäagegläschen wägen.

2. In vielen Fällen kann man die schwer lösliche Doppelverbindung der Alkaloide mit Pikrolonsäure zur Wägung bringen und daraus den Alkaloidgehalt berechnen<sup>1</sup>. Die Pikrolonsäure ist 1-p-Nitrophenyl-3-methyl-4-isonitro-5-pyrazolon. Bringt man diese Säure mit Lösungen von Alkaloiden zusammen, so fallen schwer lösliche Alkaloidpikrolonate aus, die auf einem Filtertiegel gesammelt, getrocknet und gewogen werden können.

3. Vorteilhaft kann man auch die Alkaloide, als Basen, auf alkalimetrischem Wege bestimmen. Die Basen müssen rein und vor allem frei von jeder Spur Alkali oder Säure sein, da sonst die Ergebnisse zu hoch oder zu niedrig ausfallen. Die aus dem Salz in Freiheit gesetzte Base ist deshalb in ätherischer oder Chloroformlösung zwecks Befreiung des zugesetzten Alkalis mehrmals im Scheidetrichter mit Wasser auszuwaschen. Die nach dem Verdunsten des Äthers oder Chloroforms zurückbleibende Base ist in 0,1, 0,05 oder 0,01 N gemessener überschüssiger Salzsäure oder Schwefelsäure zu lösen.

Bei Anwendung von 0,1 oder 0,05 N.-Säure läßt sich die Base bzw. die überschüssig zugesetzte Säure direkt zurückmessen, wenn man als Indicator Methylrot verwendet, von dem man einen Tropfen (1:1000 in Alkohol) zusetzt. Es ist ratsam, zum Vergleich in einen anderen Kolben die gleiche Menge Wasser einzufüllen, 1 Tropfen Indicator und 1 Tropfen 0,1 oder 0,05 N.-Alkalilauge zuzusetzen. Man erkennt alsdann den Endpunkt der Titration besser. Die Titration ist beendet, wenn die Rosafärbung in gelb umschlägt.

Ist die Menge des Alkaloids gering, so muß man mit 0,01 N.-Säure arbeiten. Als Indicator wird alsdann Jodeosin verwendet. Für diese Zwecke verwendet man Stöpselflaschen von etwa 150 ccm Inhalt aus weißem Glase, die kein Alkali abgeben. Man läßt neue Flaschen einige Tage ganz gefüllt mit 0,1 N.-Salzsäure stehen und dämpft sie nach dem Ausgießen der Säure mit Wasserdämpfen aus. Derartig gereinigte Flaschen dürfen, zu etwa  $\frac{1}{3}$  mit Wasser gefüllt und mit einer etwa 1 Finger hohen Ätherschicht und einigen Tropfen ätherischer Jodeosinlösung versehen, kein Alkali an das Wasser abgeben. Man verfährt nun bei der Bestimmung des Alkaloides in der Weise, daß man 0,1 ccm 0,01 N.-Säurelösung zusetzt, bis nach kräftigem Umschütteln das Wasser farblos ist. Meist ist jedoch der Äther sauer und man muß deshalb solange 0,01 N.-Alkalilauge zufließen lassen, bis das Wasser schwach rosa gefärbt ist. Alsdann nimmt man vorsichtig mit 0,01 N.-Säurelösung die Rosafärbung weg. Nach einigem Stehen und nach kräftigem Umschütteln darf die Lösung nicht rosa gefärbt werden. Jetzt setzt man die in gemessener überschüssiger 0,01 N.-Säure gelöste Base,

<sup>1</sup> MATTHES u. RAMMSTEDT: Zeitschr. analyt. Chem. 1907, 46, 565.

das Alkaloid, zu und titriert vorsichtig unter kräftigem Umschütteln mit 0,01 N.-Alkalilauge zurück, bis eine Rosafärbung auftritt. Zieht man die zurückgemessenen Kubikzentimeter Lauge von der angewandten Säure ab, so ergibt sich aus der Differenz die zur Bindung des Alkaloids benötigte Säure.

Sehr schwache Basen können mit 0,01 N.-Säure bzw. Lauge nicht bestimmt werden, so z. B. Hydrastin, Narcein, Narkotin, Papaverin, Theobromin, Coffein. Die starken Basen der Chinarinde lassen sich nur mit 0,1 N.-Lösung titrieren, und zwar muß als Indicator Hämatoxylin angewendet werden. In diesem Falle reagieren Chinin und Cinchonin als einsäurige Base.

1 ccm 0,1 N.-Säurelösung zeigt an g:

|                        |        |                  |        |                      |        |
|------------------------|--------|------------------|--------|----------------------|--------|
| Atropin . . . . .      | 0,0289 | Cocain . . . . . | 0,0303 | Nicotin . . . . .    | 0,0162 |
| (Hyoscyamin) . . . . . | 0,0289 | Coniin . . . . . | 0,0127 | Pilocarpin . . . . . | 0,0208 |
| Brucin . . . . .       | 0,0394 | Morphin. . . . . | 0,0285 | Strychnin . . . . .  | 0,0334 |

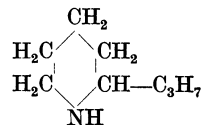
Nach der Titration kann aus den Lösungen das Alkaloid wieder gefällt und als Corpus delicti aufgehoben werden.

4. Auf colorimetrischem Wege lassen sich nach ROJAHN<sup>1</sup> die Alkaloide ebenfalls quantitativ bestimmen. Mit Hilfe eines allgemeinen Fällungsmittels, z. B. Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure, lassen sich die Alkaloide ausfällen. Die gesammelten und ausgewaschenen Alkaloiddoppelverbindungen werden zerlegt und colorimetrisch das frei gewordene Fällungsmittel bestimmt und daraus die Alkaloidmenge berechnet.

### c) Die einzelnen Alkaloide.

#### 1. Coniin( $\alpha$ -n-Propylpiperidin) C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NH.

Im Schierlingskraut (*Conium maculatum*), einer Umbellifere, finden sich verschiedene in alkalischer wäßriger Lösung durch Äther ausschüttelbare Alkaloide, das Coniin,  $\alpha$ -n-Propylpiperidin (s. Formel), Conhydrin,  $\gamma$ -Conicein und Pseudoconhydrin. Das Kraut kann leicht mit Petersilie und auch wohl mit Sellerie verwechselt werden. Es enthält 0,1%, die Samen bis zu 1% Alkaloide. Coniin ist eine ziemlich starke Base von betäubendem, an Mäuseurin erinnerndem Geruch und scharfem Geschmack. Die Base ist ein flüchtiges, verharzendes Öl, das in kaltem Wasser ziemlich schwer, in heißem Wasser noch weniger löslich ist. In Alkohol, Äther und Chloroform ist Coniin löslich, mit Wasserdämpfen ist es in alkalischer Lösung leicht flüchtig. Siedepunkt: 166,5°; Schmelzpunkt: Goldsalz = 77°, Platinsalz = 175°. —  $[\alpha]_D^{20} + 15,6^\circ$ . — Spez. Gewicht (15°) = 0,85.



Nachweis. Bei der Ausmittlung nach STAS-OTTO ist darauf zu achten, daß das Alkaloid sich nicht verflüchtigt. Man schüttelt den Äther der alkalischen Ausschüttelung mit salzsäurehaltigem Wasser aus und verdunstet die wäßrige salzsaure Lösung des Alkaloids. Um das Alkaloid zu reinigen, bedient man sich der leichten Flüchtigkeit der Base mit Wasserdämpfen aus alkalisch-wäßriger Lösung.

Reaktionen. 1. Sinnenprüfung. Nach Mäuseurin riechende, ölige Tropfen, namentlich wenn man die Base auf einem Uhrgläschen in der Hand erwärmt. Die frisch hergestellten Krystalle des Chlorhydrates sind doppelbrechend, Unterscheidung von Nicotin, (die allgemeinen Farbreagenzien geben keine Reaktion).

2. Pikrolonat. Die rhombischen Krystalle schmelzen bei 195,5° und sind in heißem Äther und Alkohol leicht löslich.

3. Reaktion nach MELZER. Nach Zusatz von 2 Tropfen Schwefelkohlenstoff und 2 ccm Alkoholentsteht bei Gegenwart von Coniin ein thiocarbaminsaures Salz, das mit verd. Kupferchlorid- und Eisenchloridlösung braune Färbungen gibt. Beweis einer sekundären Base.

<sup>1</sup> ROJAHN: Arch. Pharm. 1930, 268, 499.

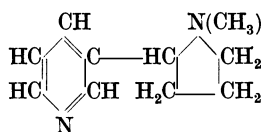
3. Der physiologische Nachweis am Frosch besteht bei subcutaner Einspritzung in einer typischen Lähmung, Curarewirkung.

Die anderen Alkaloide des Schierlings geben eine dem Coniin ähnliche Reaktion.

Besonders sei hervorgehoben, daß in faulenden Leichenteilen häufiger dem Coniin ähnliche Ptomaine gefunden wurden, und ist deshalb Vorsicht geboten.

## 2. Nicotin ( $C_{10}H_{14}N_2$ ).

In den Blättern des Tabaks (*Nicotiana tabacum*, einer Solanacee) finden sich neben dem sehr giftigen Nicotin, dem  $\alpha$ -Pyridyl- $\beta$ -tetrahydro-n-methylpyrrol (s. Formel), das eine bitertiäre Base ist, noch die Alkaloide



Nicotein, Nicotimin und Nicotellin, die für die Ausmittlung von Giften jedoch belanglos sind. Der Nicotiningehalt des Tabaks schwankt zwischen 1—5%. Die freie Base des Nicotins stellt ein an der Luft verharzendes, farbloses Öl vor, das stark alkalische Reaktion besitzt und mit Wasserdämpfen flüchtig

ist. In Wasser, Alkohol, Äther und Petroläther ist das Nicotin leicht löslich. Wegen der Flüchtigkeit ist bei der Ausmittlung gleiches wie beim Coniin zu beachten. Siedepunkt = 246—247°;  $[\alpha]_D = -168,2^\circ$ ; Spez. Gewicht (20°) = 1,01101.

Reaktionen. 1. Sinnenprüfung. Geruch eigenartig; ölige Tropfen, die verharzen.

2. Die allgemeinen Farbreagenzien geben keine Reaktion.

3. Das Nicotinpicrolonat bildet prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 213°.

4. ROUSSINS-Krystalle<sup>1</sup>. Versetzt man eine ätherische Nicotinlösung mit der gleichen Menge ätherischer Jodlösung, so bildet sich bei Anwesenheit von wenig Nicotin eine Trübung. Allmählich scheiden sich, namentlich wenn mehr Nicotin vorhanden ist, rote Krystalle ab, die das Licht mit blauer Farbe reflektieren.

5. SCHINDELMEYERSche Reaktion. Wird eine Menge von etwa 0,01 g Nicotin in 1 Tropfen 30% reinem Formaldehyd gelöst und fügt man nach einigen Stunden einen Tropfen konz. Salpetersäure zu, so entsteht alsdann eine dunkelrote Färbung.

6. Einige Krystalle p-Dimethylamidobenzaldehyd werden in rauchender Salzsäure gelöst. Fügt man nun diesem Reagens, das sich auf einem Uhrglas befindet, von der Seite her einen Tropfen des in Wasser gelösten Nicotins zu, so entsteht an der Berührungszone eine Violett-färbung, die sich später in der Flüssigkeit verteilt. Coniin und Pyridin geben diese Reaktion nicht (TUNMANN<sup>2</sup>). Kleinste Nicotinmengen können nach A. WENUSCH<sup>3</sup> mittels Chlordinitrobenzol und der Kaliumplatinjodid-Reaktion nach SELMI nachgewiesen werden.

7. Physiologische Wirkung. Spritzt man eine Spur des salzsauren Salzes, in etwas physiologischer Natriumchloridlösung gelöst, einem Frosch unter die Haut, so entsteht nach vorheriger Reizung eine Lähmung des Gehirns und der Atemmuskeln, scheinbare Curarewirkung. Es tritt eine ganz typische Stellung, Sitzstellung mit ausgebreiteten Vorderbeinen, ein. Ferner beobachtet man Flimmern der Muskeln in den Flanken. Die Versuche sind durch den Physiologen auszuführen oder nachzuprüfen.

## 3. Taxin.

In den Blättern, Zweigen und Früchten des Taxus (*Taxus baccata*), ausgenommen der fleischige süße Arillus der Frucht, kommt ein Alkaloid, das Taxin, vor. Außerdem findet sich noch ein Glucosid, das Taxikatin, neben ätherischem Öl in den Blättern und Zweigen. Taxin ist leicht löslich in Alkohol und Äther. — Schmelzpunkt 105—110°.

Nachweis: Mageninhalt und Erbrochenes sind auf Fragmente von Blatt- und Stengelteilen zu untersuchen. Das Taxin geht nach STAS-OTTO in der natronalkalischen Ausschüttung in den Äther über.

Reaktionen: 1. Nach VREVEN: Konz. Salpetersäure ruft eine blaßblaue Färbung hervor, die auf Zusatz von rauchender Salzsäure rosenrot wird<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> C. KIPPENBERGER: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, 42, 232.

<sup>2</sup> O. TUNMANN: Apoth.-Ztg. 1918, 33, 485; C. 1919, II, 227.

<sup>3</sup> A. WENUSCH: Z. 1934, 67, 601.

<sup>4</sup> Pharm. Jahresb. 1896, 507.

2. Konz. Schwefelsäure ruft eine rötlichbraune Färbung hervor, die auf Zusatz von Molybdänlösung dunkelviolet und auf Zusatz von Kaliumbichromat rotblau wird.

#### 4. Veratrin ( $C_{32}H_{49}O_9N$ ).

In dem Samen von *Sabadilla officinarum* und der Wurzel von *Veratrum album*, weißer Nieswurz, zu den Liliaceen gehörenden Pflanzen, wurden verschiedene Alkaloide gefunden, die wenigstens teilweise physiologisch ähnliche Wirkungen besitzen. Chemisch verhalten sich die Alkaloide des Sabadillsamens und der Nieswurzel verschieden. Im Sabadillsamen finden sich hauptsächlich Veratrin und Cevadin, letzteres ist krystallin. Durch alkoholische Kalilauge zerfällt das Cevadin in Cevin und Angelicasäure, das Veratrin in Verin und Veratrumsäure. Die Alkaloide der Nieswurzel sind Jervin und Protoveratrin neben anderen Alkaloiden.

Nachweis. Da Veratrin nur schwach basische Eigenschaften besitzt, so findet man es in der nach STAS-OTTO bereiteten, schwach sauren Ätherauschüttelung. Das officinelle Veratrin ist ein Gemisch zweier isomerer, amorpher Alkaloide. Der isolierte Rückstand ist amorph. Es schmeckt brennend, und reizt der Staub zum Niesen. Schmelzpunkt  $150-155^{\circ}$  zu einer gelben Flüssigkeit, die später erstarrt.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure löst Veratrin mit gelber Farbe auf, die bald einen orangefarbenen Ton annimmt und stark fluoresciert, später wird die Flüssigkeit rot. FRÖHDES und ERDMANNs Reagens rufen ähnliche Farbreaktionen hervor.

2. Konz. Salpetersäure gibt mit Veratrin eine gelbe Färbung.

3. WEPPEs Reaktion. Wird Veratrin mit der fünffachen Menge Saccharose verrieben, so tritt auf Zusatz von konz. Schwefelsäure zuerst eine Gelbfärbung ein, die vom Rande des Uhrglases her grün und später blau wird. Auf Zusatz von Wasser verschwindet die Reaktion.

4. GRANDEAUs Reaktion. Konz. Schwefelsäure färbt Veratrin gelb. Setzt man sogleich nach der Gelbfärbung etwas Bromwasser zu, so tritt eine Purpurrotfärbung auf.

Physiologischer Versuch. Eine geringe Menge des in das essigsaure Salz übergeführten Veratrins wird einem Frosch unter die Haut gespritzt. Es treten Brechbewegungen auf, und der Puls fällt von 60 bis auf 30 und weniger Schläge herab. Größere Mengen lösen eine bemerkbare Veränderung in der Bewegung aus, die zu Streckkrämpfen führt.

Die Alkaloide des Nieswurztes unterscheiden sich nach GADAMER (Lehrbuch der chemischen Toxikologie) durch folgende Reaktionen:

| Alkaloid                               | Konz. Schwefelsäure                                 | Konz. Salzsäure  | Zucker + konz. Schwefelsäure (WEPPE)           | VITALISCHE Reaktion |
|--|---|--|--|---------------------|
| Jervin<br>$C_{26}H_{37}O_3N + H_2O$    | gelb, grüngelb, dunkelgrün, schmutziggrün und braun | erst farblos, dann schwach hellrosa  | goldgelb, braun, dunkelbraun                   | dunkelgelb          |
| Rubjervin<br>$C_{26}H_{43}O_2N + H_2O$ | goldgelb, orangerot, dunkelrot                      | in der Kälte farblos, in der Wärme rotviolett, dann gelblich unter Abscheidung einer amorphen Substanz | hellbraun, rotbraun, dunkelbraun               | —                   |
| Pseudojervin<br>$C_{26}H_{43}O_7N$     | grünlichgelb, grün, schmutziggrün                   | in der Kälte farblos, heiß hellgrünlich  | —  | —                   |
| Protoveratrin<br>$C_{32}H_{51}O_{11}N$ | gelbgrün, grünlich blau, blaviolett                 | kalt farblos, heiß rosa  | goldgelb, grünlichgelb, grünbraun, dunkelbraun | dunkelgelb          |



Zu bemerken ist noch, daß verschiedentlich Leichenalkaloide, Leichenveratrin, mit ähnlichen Reaktionen wie Veratrin gefunden wurden, die jedoch die WEPPENSCHE Reaktion nicht gaben und auf Zusatz von Schwefelsäure sich violett färbten. Auch blieb die typische physiologische Wirkung aus.

### 5. Colchicin $C_{22}H_{25}NO_6$ .

In den Samen der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*), einer Liliacee, findet sich, wie auch in ihrer Zwiebel, ein stark giftiges Alkaloid, das Colchicin, vor. Es bildet eine gelblichweiße, amorphe Masse von bitterem Geschmack. In Wasser, Alkohol und Chloroform löst es sich leicht, während Äther es nur schwer löst. Aus weinsaurem Lösung läßt sich das Colchicin durch Äther, leichter aus ammoniakalischer Lösung durch Chloroform ausschütteln. Das Colchicin wird durch Kochen in angesäuerter wäßriger Lösung in Methylalkohol und Colchicein zerlegt. Infolge geringer Resorption tritt die Giftwirkung erst nach Stunden ein. — Schmelzpunkt  $145\text{--}147^\circ$ . Colchicin dreht das polarisierte Licht nach links.

Nachweis. Mageninhalt und Erbrochenes sind auf Fragmente des Samens und der Zwiebelschalen zu untersuchen. Auf Colchicin ist in erster Linie Magen- und Darminhalt zu prüfen. Da Colchicin infolge seiner Enolform nur schwach basische Eigenschaften besitzt, so findet es sich in der wäßrig weinsauren Ätherausschüttelung nach STAS-OTTO. Mineralsäurelösungen sind zu vermeiden. Es ist deshalb eine vorherige Neutralisation notwendig. Besser als Äther führt Chloroform das Colchicin in Lösung. Vorher sind Fettsuren aus der wäßrigen weinsauren Lösung durch Petroläther, in dem Colchicin fast unlöslich ist, zu entfernen. Das Colchicin widersteht in Leichen längere Zeit der Zersetzung. Das Mikrosublimat des Colchicins besteht aus öligen Tröpfchen.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure färbt Colchicin gelb. Auf Zusatz einer Spur Salpeter tritt eine Grün-Blau-Violett- und zuletzt blasse Gelbfärbung ein. FRÖHDES und ERDMANN'S Reagens geben ähnliche Färbungen.

2. Konz. Salzsäure löst Colchicin mit gelber Farbe auf. Setzt man eine Spur Eisenchloridlösung zu und kocht einige Minuten, so tritt eine dunklere Färbung auf. Nach dem Erkalten färbt sich die Flüssigkeit auf Zusatz von Wasser olivgrün. Wird diese Lösung mit einigen Tropfen Chloroform geschüttelt, so wird das Chloroform gelbbraun und dann granatrot gefärbt.

3. Konz. Salpetersäure (Spez. Gew. 1,4) löst Colchicin mit violetter Farbe, die alsdann in Gelb übergeht. Setzt man dieser gelb gewordenen Lösung verd. Natron- oder Kalilauge bis zur alkalischen Reaktion zu, so färbt sich die Lösung orange gelb oder orangerot.

Physiologischer Versuch. Weiße Mäuse zeigen bei Anwesenheit von Colchicin Durchfälle, die zum Tode führen. Frösche reagieren bei einer Temperatur von  $30\text{--}32^\circ$  stärker als bei Zimmertemperatur. BAUMERT konnte ein Leichencolchicin aus einer faulenden Leiche isolieren. Dieses verhält sich gegenüber Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure und Salzsäure-Eisenchloridlösung anders als Colchicin.

### 6. Aconitin und Pseudoaconitin.

In dem Sturmhut (*Aconitum napellus*) und einigen andern *Aconitum*-Arten, die zu den Ranunculaceen zählen, finden sich hauptsächlich zwei Alkaloide, die von besonderer Wichtigkeit sind, das Aconitin und Pseudoaconitin; dem Pseudoaconitin kommt die stärkere Giftwirkung zu. Durch Erhitzen bei Gegenwart von Mineralsäuren werden diese Alkaloide in Essigsäure, Benzoesäure, Veratrumssäure und Aconin und Pseudoaconin gespalten, es sind esterartige Verbindungen.

Aconitin (Acetyl-benzoyl-Aconin),  $C_{34}H_{47}O_{11}N$ , ist in Wasser wenig löslich, aber leicht löslich in Alkohol, Äther und Chloroform, fast unlöslich in Petroläther.

Das Aconitin hat einen brennenden, scharfen Geschmack und besitzt als Base eine jedoch nur schwach alkalische Reaktion. Schmelzpunkt 197—198°. Aconitin ist optisch aktiv, seine Salze sind linksdrehend, während die Base rechtsdrehend ist.

Pseudoaconitin,  $C_{36}H_{49}O_{12}N$ . Die Löslichkeitsverhältnisse sind ähnlichen des Aconitins. In Äther ist es fast unlöslich. Ein geschmacklicher Unterschied besteht gegenüber Aconitin nicht. Da Aconitin, wie erwähnt, bei der Hydrolyse Essigsäure und Benzoesäure bildet, während Pseudoaconitin in Essigsäure und Veratrumsäure gespalten wird, so geben beide nicht die gleichen Reaktionen.

Das im Handel befindliche Aconitin besteht aus Gemischen beider Alkaloide, neben den noch in der Pflanze vorhandenen anderen Alkaloiden.

Nachweis. Im Mageninhalt und Erbrochenen kann man nach Pflanzenfragmenten fahnden. Das Aconitin selbst geht in das Blut und die edleren Organe über. Da die Alkaloide durch Mineralsäuren leicht zersetzt werden, so müssen bei der Ausmittlung die Auszüge vorher alkalisch und dann schwach weinsauer gemacht werden. Die Auszüge sind bei niedriger Temperatur herzustellen, der Alkohol ist ebenfalls bei geringer Temperatur zu verdunsten, der mit Wasser aufgenommene schwachsaure Rückstand wird zur Entfernung des Fettes mit Petroläther ausgeschüttelt, die Lösung alsdann mit Natriumbicarbonat alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt. Mit einem Teil des Rückstandes wird nach JÜRGENS das Jodid in folgender Weise hergestellt: der Rückstand wird in verd. Essigsäure gelöst und etwas Jodkalium zugesetzt. Die Lösung läßt man verdunsten und nimmt das überschüssige Jodkalium mit einer Spur Wasser weg. Unter dem Mikroskop betrachtet, läßt die Krystallform des Alkaloidjodides Schlüsse zu, ob es sich um Aconitin oder Pseudoaconitin handelt. Reines Aconitin gibt rhombische, tafelförmige Krystalle, die an den spitzen Kanten abgestumpft und mitunter schief kreuzförmig durchwachsen sind.

Das Alkaloid ist zwecks physiologischer Untersuchung möglichst zu reinigen. MECKE fand in Leichenteilen und altem Harn ein Leichen-Aconitin; es gibt die gleichen Reaktionen mit Schwefelsäure usw., wie das Aconitin selbst.

### 7. Delphinin, $C_{22}H_{35}NO_6$ .

In den Samen einiger Delphinium-Arten kommen verschiedene giftige Alkaloide, unter andern Delphinin, Delphinoidin, Staphisagrין, vor. Die Zersetzlichkeit ist ähnlich der der Aconitalkaloide. Bei der Ausmittlung müssen deshalb auch die gleichen Vorsichtsmaßregeln angewendet werden.

### 8. Hydrastisalkaloide.

Hydrastin,  $C_{21}H_{21}NO_6$ . In der Hydrastis-Wurzel (*Hydrastis canadensis*), einer Ranunkulacee, finden sich verschiedene Alkaloide, das Hydrastin, das Berberin,  $C_{20}H_{18}NO_4OH$  und das Canadin,  $C_{20}H_{21}NO_4$ , die giftig wirkende Eigenschaften besitzen. Das Fluidextrakt findet arzneiliche Anwendung. Das Hydrastin ist eine tertiäre Base. Durch Einwirkung von Salpetersäure bildet sich Hydrastinin,  $C_{11}H_{11}NO_2 + H_2O$ , das auch synthetisch hergestellt worden ist. Hydrastin und Hydrastinin stehen chemisch in enger Beziehung zum Narkotin. In Wasser ist Hydrastin unlöslich, leicht löslich in heißem Alkohol, Chloroform und Benzol. Das Hydrastin bildet glänzende, weiße, bitterschmeckende und alkalisch reagierende Prismen mit dem Schmelzpunkt 132°. In verd. Salzsäure gelöst, dreht das Hydrastin rechts, während die in Chloroform gelöste Base links dreht.

Berberin,  $C_{20}H_{18}O_4N \cdot OH$ , ist eine quaternäre Ammoniumbase. Aus alkalischen wäßrigen Lösungen wird es von Chloroform oder Äther aufgenommen

und scheidet sich nach Verdunsten des Lösungsmittels als braungefärbte Masse aus. Die Salze des Berberins sind stark gelb gefärbt.

Canadin spielt nur eine untergeordnete Rolle und ist für den Nachweis der Alkaloide in der Hydrastiswurzel nebensächlich.

Nachweis. Der nach dem STAS-OTTOSCHEN Verfahren bereitete Auszug wird mit Petroläther von fettigen Anteilen befreit. Aus dem schwach ammoniakalisch gemachten wäßrigen Auszug werden die Alkaloide mit Äther ausgeschüttelt, die zur Identifizierung in üblicher Weise vorher gereinigt werden müssen.

Hydrastin gibt folgende Reaktionen: 1. Konz. Schwefelsäure färbt Hydrastin in der Kälte nicht, beim Erwärmen tritt Violettfärbung ein.

2. FRÖHDE'S Reagens färbt grün und dann braun.

3. MANDELIN'S Reagens färbt rot und dann orange.

4. Wird Hydrastin in verd. Schwefelsäure gelöst und setzt man einige Tropfen verd. Kaliumpermanganatlösung zu, so tritt eine blaue Fluoreszenz ein, die durch die Bildung von Hydrastinin hervorgerufen wird.

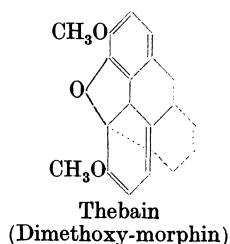
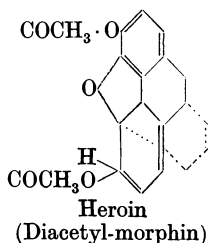
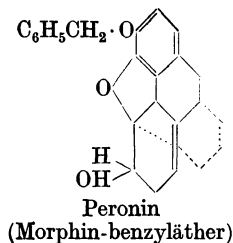
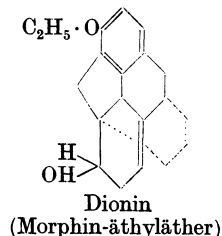
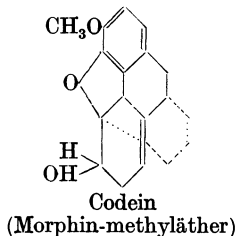
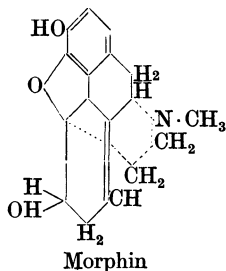
Das Berberin kann man aus der schwach ammoniakalischen Lösung, nachdem sie mit Natronlauge stark alkalisch gemacht ist, mit Äther ausschütteln. Die stark gelbe Farbe der Salze weist schon auf die Anwesenheit des Berberins bzw. der Alkaloide der Hydrastiswurzel hin. Die Reaktionen des Berberins sind nicht charakteristisch. Die gelbe Fluoreszenz tritt schon unter der Quarzlampe auf.

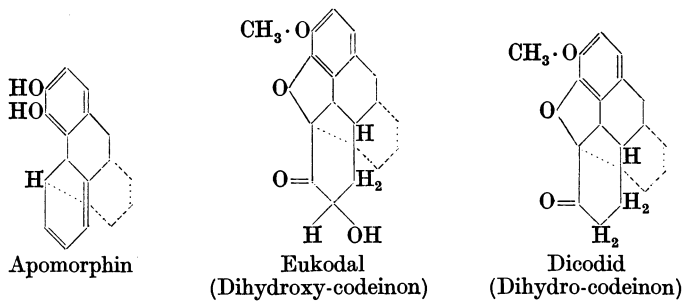
## 9. Opium und Opiumalkaloide.

### a) Allgemeines.

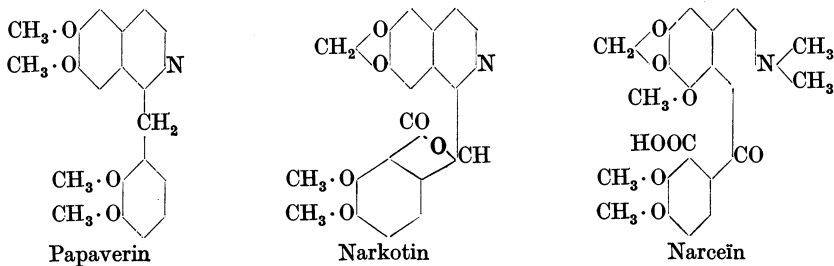
Die Kapseln des Mohns (*Papaver somniferum*), eine im Orient vorkommende Mohnart, enthalten einen Milchsaft, der beim Anritzen der Kapseln austritt und erhärtet. Dieser erhärtete Saft wird gesammelt und ist das Opium des Handels. In ihm findet sich eine Reihe von Alkaloiden, etwa 20 verschiedene Arten, die teils an Schwefelsäure, teils an Milchsäure oder Meconsäure gebunden sind. Ferner finden sich noch zwei indifferente Stoffe, das Meconin und Meconisin, im Opium vor. Die Mengenverhältnisse der hauptsächlichsten Alkaloide im Opium siehe folgende Seite.

### Konstitution der wichtigsten Opiumalkaloide.





In allen 9 Formeln ist die N-tragende Spange, deren Stellung noch fraglich ist, gestrichelt.



Papaverin, Narkotin und Narcein sind Isochinolinderivate.

|                    |        |                     |          |                   |          |
|--------------------|--------|---------------------|----------|-------------------|----------|
| Morphin . . . . .  | 10—14% | Papaverin . . . . . | 0,5—1%   | Thebain . . . . . | 0,2—0,5% |
| Narkotin . . . . . | 4—8%   | Codein . . . . .    | 0,2—0,8% | Narcein . . . . . | 0,1—0,4% |

Morphin, Oxydimorphin, Codein und Thebain stehen in Beziehung zum Phenanthren, während Narkotin, Narcein, Papaverin, Laudanosin zu Abkömmlingen des Isochinolins zu rechnen sind.

In der Arzneikunde wird Opium, sein alkoholischer Auszug, Opiumtinktur, und ein gereinigtes Opium, das Pantopon angewandt, in welchem Morphin, Codein und Narkotin, wie unten beschrieben, nachweisbar sind. Ferner sind ähnliche Präparate im Handel unter dem Namen Laudopon, Opon, Opiopan, Nealpon u. a. Das Opon soll kein Morphin enthalten. Laudopon enthält die Alkaloide an Mekonsäure gebunden.

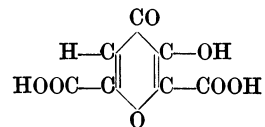
Opiumalkaloide, die in der Arzneikunde Verwendung finden, und deren Derivate sind vornehmlich folgende:

1. Morphin, Morphosan, Apomorphin, Euporphin, Heroin. — 2. Codein, Eukodal, Dionin, Peronin. — 3. Narkotin, Cotarnin. — 4. Papaverin. — 5. Thebain. — 6. Narcein.

Neben den Alkaloiden des Opiums findet sich Mekonsäure zu rund 4% und Mekonin zu 0,3% im Opium.

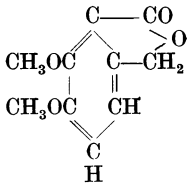
**Mekonsäure, Oxypyrondicarbonsäure.**  $C_7H_4O_7 + 3 H_2O$ .

Die Mekonsäure bildet Blättchen oder rhombische Tafeln, die bei 100° ihr Krystallwasser verlieren. Als Lösungsmittel, die in der Wärme Mekonsäure lösen, kommen neben Wasser Alkohol, Äther und Amylalkohol in Betracht. In der Kälte lösen Essigäther und Methylalkohol Mekonsäure leicht. Durch



Kochen mit Wasser, namentlich bei Gegenwart von etwas Salzsäure, spaltet die Mekonsäure Kohlensäure ab und geht in Komensäure (Oxy-pyron-carbonsäure) über. Mekonsäure: Schmelzpunkt 150°. Ausmittlung S. 1348.

**Mekonin**,  $C_{10}H_{10}O_4$ , ist das innere Anhydrid der Mekonsäure.



Die Löslichkeit des Mekonins in kaltem Wasser ist sehr gering, während es in siedendem Wasser, Alkohol, Äther, Benzol und Chloroform leicht löslich ist. Es reagiert neutral und sublimiert unzersetzt. Das Mekonin ist das Lacton einer  $\alpha$ -Oxysäure und gibt deshalb mit Alkalien leicht lösliche Salze. Schmelzpunkt =  $102-103^\circ$ .

Nachweis. Man bereitet einen alkoholischen, schwach schwefelsauren Auszug der Objekte nach der Methode von STAS-OTTO. Die Lösung schüttelt man mit Benzol aus, in welcher sich das Mekonin löst. In dem Verdampfungsrückstand der Benzollösung bleiben vielfach schon bei Gegenwart von Mekonin dessen Krystalle zurück. Fügt man zu dem Rückstand einige Tropfen konz. Schwefelsäure, so wird er bei Anwesenheit von Mekonin grünlich gefärbt. Nach Verlauf von zwei Tagen ist die Grünfärbung in eine Rotfärbung übergegangen; erwärmt man diese rote Lösung, so geht sie von Smaragdgrün über Blauviolett wieder in Rot über.

#### b) Nachweis von Opium.

Den Nachweis von Opium in Leichenteilen, Mageninhalt, Erbrochenem oder Harn führt man durch den Nachweis der Opiumalkaloide sowie der Mekonsäure. Die Objekte werden mit Alkohol versetzt und mit Salzsäure schwach angesäuert. Man läßt die Mischung bei etwa  $60^\circ$  einige Stunden stehen und filtriert oder kocht von dem Ungelösten ab. Die klare Lösung wird auf dem Wasserbade eingeeengt, bis der Alkohol verdunstet ist, dann mit Wasser aufgenommen und zwecks Entfernung färbender Substanzen mit Äther ausgeschüttelt. Man gibt nunmehr erwärmten Amylalkohol zu und schüttelt die warme Lösung mehrmals damit aus. Im Verdunstungsrückstand des Amylalkohols kann die Mekonsäure nachgewiesen werden. Man säuert mit Salzsäure schwach an und fügt einige Tropfen Eisenchloridlösung zu. (Weiteres s. unten.) Auch kann man so verfahren, daß man den alkoholischen Auszug bis zur Trockene verdampft, den Rückstand mit heißem Wasser aufnimmt und filtriert. Ist die Lösung stärker gefärbt, so kann man durch Ausschütteln mit Benzol den Farbstoff wegnehmen. Der wäßrigen Lösung setzt man nun Magnesiumoxyd zu, kocht und filtriert von dem ungelösten Magnesiumoxyd ab. Nachdem man das Filtrat auf ein kleines Volumen eingedampft hat, fügt man einige Tropfen Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion zu. Nach Zusatz von einigen Tropfen Eisenchloridlösung muß bei Anwesenheit von Mekonsäure eine blut- bis braunrote Färbung entstehen. Fügt man alsdann noch einige Tropfen verd. Salzsäure zu, so darf keine Gelbfärbung bzw. Entfärbung, selbst nach dem Erhitzen nicht, eintreten. Einige Tropfen Goldchloridlösung dürfen die Färbung nicht zum Verschwinden bringen.

Die durch Abspaltung von Kohlensäure aus der Mekonsäure sich bildende Komensäure gibt mit Eisenchlorid dieselbe Reaktion wie Mekonsäure.

#### c) Opiumalkaloide und Abkömmlinge.

**$\alpha$ ) Morphin**,  $C_{17}H_{19}NO_3 + H_2O$ , krystallisiert mit 1 Mol Krystallwasser und bildet farblose, durchscheinende Nadeln oder kurze rhombische Prismen von stark bitterem Geschmack. Als tertiäre Base gibt das Morphin mit Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Salicylsäure u. a. krystallisierende Salze, die meist als solche in der Arzneimittellkunde Anwendung finden. Das Morphin bzw. seine Salze werden von sämtlichen Alkaloiden des Opiums in der Medizin am meisten gebraucht. Die Base selbst ist in den meisten Lösungsmitteln schwer

löslich. Die besten Lösungsmittel sind heißer Alkohol, Chloroform und Amylalkohol. Infolge seines Phenolcharakters gibt Morphin mit ätzenden Alkalien lösliche Salzverbindungen, Phenolate, die in Wasser leicht löslich sind. Durch Ammoniak oder Natriumbicarbonat wird Morphin aus seinen Salzverbindungen in wäßriger Lösung als Base abgeschieden.

Die Base ist leicht oxydierbar, wirkt auf Metallsalzlösungen reduzierend und scheidet aus Jodsäure Jod ab. — Schmelzpunkt  $230^{\circ}$  bei langsamem Erhitzen. Die Lösungen des Morphins und seiner Salze haben linksdrehende Eigenschaften.  $[\alpha]_D = -98,41^{\circ}$  für das salzsaure Salz.

**β) Apomorphin** ( $C_{17}H_{17}O_2N$ ). Wird Morphin oder Codein mit überschüssiger Salzsäure erhitzt, so spaltet es unter Umlagerung des Alkohol-Hydroxyls Wasser ab und bildet ein zweites Phenolhydroxyl, das sog. Apomorphin. Frisch gefällt, ist Apomorphin eine weiße, schwer krystallisierbare Masse, die in Wasser schwer löslich ist, leicht löslich dagegen in Alkohol, Äther und Chloroform. Mit ätzenden Alkalien bildet es infolge seiner zwei Phenolgruppen, wie Morphin, in Wasser lösliche Phenolate. An der Luft nimmt Apomorphin bald eine grüne Färbung an; Wasser und Alkohol nehmen die Farbe des Apomorphins an. Aus einer solchen Lösung nehmen Äther und Benzol grün gefärbtes Apomorphin nach Zusatz von Ammoniak mit purpurroter Farbe auf, während Chloroform es mit violetter Farbe löst. Die grüngefärbte Apomorphinlösung wird auf Zusatz von Alkalien purpurrot. Mit Säuren bildet Apomorphin infolge seines Basencharakters in Wasser lösliche Salze.

**γ) Morphosan** (Morphinmethylbromid)  $C_{17}H_{19}O_3N < \begin{matrix} CH_3 \\ Br \end{matrix} + H_2O$ . Wird Morphin mit Methylbromid bei Gegenwart von Alkohol erhitzt, so lagert sich Methylbromid an. Es bilden sich farblose, feine Nadeln, die in kaltem Wasser löslich und leicht löslich in heißem Wasser sind. Methyl- und Äthylalkohol lösen Morphosan ziemlich schwer auf. In Aceton, Chloroform und Äther ist es unlöslich. Durch Bromkalium läßt sich Morphosan aussalzen. Durch Alkalilauge, Ammoniak und Natriumcarbonat wird Morphosan aus wäßriger Lösung nicht gefällt. Morphosan ist eine quaternäre Base. Schmelzpunkt  $265-266^{\circ}$ .

**δ) Euporphin**,  $C_{17}H_{17}O_2N < \begin{matrix} CH_3 \\ Br \end{matrix}$ . Es wird durch längere Einwirkung von Brommethyl auf Apomorphin in ätherischer Lösung hergestellt; es bildet kleine, schwach glänzende Nadelchen von stark bitterem Geschmack. Euporphin ist als Salz einer quaternären Base aus diesem Grunde in Äther, Chloroform usw. nicht löslich. Mit Natronlauge geschüttelt, wird die Lösung dunkelrot gefärbt. — Schmelzpunkt  $155-156^{\circ}$ .

**ε) Heroin** (Diacetylmorphin),  $C_{17}H_{17}O_3N(C_2H_3O)_2$ . Durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Morphin entsteht Heroin, das als salzsaures Salz medizinische Anwendung findet. Die Base bildet weiße Prismen von bitterem Geschmack; sie ist in Wasser fast unlöslich, in Äther und kaltem Alkohol nur schwer, in heißem Wasser, Alkohol, Chloroform und Benzol ziemlich leicht löslich. Durch Einwirkung von Alkalien, Ammoniak und Natriumcarbonat wird die Base gefällt, ein Überschuß von Ammoniak oder Alkalien löst aber die Base wieder auf. Durch verd. Säure und auch schon durch Kochen mit Wasser wird die Base in Morphin und Essigsäure gespalten. — Schmelzpunkt  $171-173^{\circ}$ .

**ζ) Codein** (Methyl-morphin)  $C_{18}H_{21}O_3N$ . In geringer Menge findet sich Codein im Opium. Das meiste Codein, das arzneilich eine Rolle spielt, wird synthetisch durch Erhitzen von 1 Molekül Morphin, Natriumhydroxyd und Jodmethyl in methylalkoholischer Lösung auf  $60^{\circ}$  hergestellt. Aus wasserfreiem Äther oder Benzol scheidet es sich in kleinen, rhombischen, wasserfreien Krystallen aus, die stark bitter schmecken. Aus wasserhaltigen Lösungen

krystallisiert es mit 1 Mol. Krystallwasser und schmeckt schwach bitter. In kaltem Wasser und Petroläther ist Codein schwer, in heißem Wasser leicht löslich, ebenso in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol und Amylalkohol. Mit Säuren bildet es Salze. Arzneilich wird meist phosphorsaures Codein verwendet. Wird Codein mit starken Mineralsäuren erhitzt, so bildet sich Apomorphin. Alkalilaugen fällen Codein quantitativ, während es aus seinen Salzlösungen durch Ammoniak nicht gefällt wird. — Schmelzpunkt  $155^{\circ}$  (wasserfrei);  $[\alpha]_D^{20} = -137,75^{\circ}$ .

7) **Dicodid** (Dihydrocodeinon)  $C_{18}H_{21}NO_3$ . Arzneilich wird das weinsaure- und salzsaure Salz benutzt. Das salzsaure Salz bildet feine weiße Nadeln, die in Alkohol und Wasser leicht löslich sind. Dem salzsauren Salz kommt die Formel  $C_{18}H_{21}NO_3 \cdot HCl + 2H_2O$  zu. — Schmelzpunkt der Base  $193-194^{\circ}$ .

8) **Dionin** (salzsaures Äthylmorphin)  $C_{17}H_{17}NO(OH)(OC_2H_5) \cdot HCl + 3H_2O$ . Unter Dionin wird das salzsaure Salz des Äthylmorphins verstanden. Die Darstellung ist ähnlich der des Codeins. Das salzsaure Salz ist ein weißes, krystallines Pulver, das in Alkohol und Wasser leicht löslich ist. Die freie Base ist in Wasser schwer, leicht löslich in Alkohol, Äther und Chloroform. — Schmelzpunkt der Base  $110-120^{\circ}$ .

9) **Peronin** (salzsaures Benzylmorphin)  $C_{17}H_{17}NO(OH)(OC_7H_7) \cdot HCl$ . Die Base bildet glänzende Prismen oder Tafeln, die in Wasser fast unlöslich, dagegen in Alkohol, Äther, Benzol und Chloroform leicht löslich sind. Peronin wird durch Kochen von Morphin mit Natriumäthylat und Benzoylchlorid hergestellt. Das salzsaure Salz ist in Wasser und Alkohol schwer löslich, von bitterem Geschmack und spaltet sich beim Kochen in Benzoylchlorid und Apomorphin. — Schmelzpunkt der Base  $131-132^{\circ}$ , bei vorheriger Trocknung bei  $100^{\circ}$ .

\*) **Narkotin**,  $C_{22}H_{23}NO_7$ . Es ist ein Bestandteil des Opiums. Aus Alkohol krystallisiert es in langen, farblosen, glänzenden Nadeln, die geschmacklos sind und keine alkalische Reaktion zeigen. In kaltem Wasser ist Narkotin nicht, in heißem Wasser nur sehr schwer löslich. Leichter löslich ist es in siedendem Alkohol und Chloroform, ferner in Äther, Essigäther und Benzol, zum Unterschied von Morphin, welches sich in Benzol nicht löst. Der Basencharakter des Narkotins ist sehr schwach; es bildet deshalb nur mit starken Säuren Salze, die in Wasser hydrolytisch gespalten werden und deren Lösungen deshalb sauer reagieren. Durch Chloroform läßt es sich schon in saurer Lösung ausschütteln, durch Natriumacetat wird es aus seinen wäßrigen Salzlösungen als Base gefällt. Narkotin zählt zu den Isochinolin-Derivaten. — Schmelzpunkt  $176^{\circ}$ . Die Base dreht das polarisierte Licht nach links, die Salze dagegen in saurer Lösung nach rechts ab.

2) **Cotarnin**,  $C_{12}H_{15}NO_4$ . Es ist ein Oxydations- und Spaltungsprodukt des Narkotins. Aus Benzol krystallisiert, bildet es farblose, sternförmige Nadeln, die in heißem Wasser schwer, leicht in Alkohol und Äther, nicht aber in Kalilauge sich lösen. Cotarnin ist eine einsäuerige, alkalisch reagierende, bitter schmeckende, quaternäre Base, die mit Säuren leicht lösliche und gut krystallisierende Salze gibt. Das salzsaure Salz, Stypticin, und das phthalsaure Salz, Styptol, finden arzneiliche Anwendung. — Schmelzpunkt  $102-105^{\circ}$ .

μ) **Papaverin**,  $C_{20}H_{21}NO_4$ . Es ist ein weiterer, wenn auch in bedeutend geringerer Menge als Morphin vorkommender Bestandteil des Opiums und bildet farblose, geschmacklose, neutral reagierende Prismen, die in heißem Alkohol, Chloroform und Aceton leicht, in kaltem Alkohol, Äther und Benzol schwer löslich sind. Als schwache Base reagieren die Salze in wäßriger Lösung stark sauer, infolgedessen ist Papaverin aus saurer Lösung als freie Base ausschüttelbar. Am geeignetsten als Ausschüttelungsmittel ist Chloroform. Neuerdings findet Papaverin in der Arzneikunde häufiger Anwendung. — Schmelzpunkt  $147^{\circ}$ .

r) **Thebain**,  $C_{19}H_{21}NO_3$ . Es kommt ebenfalls in sehr geringer Menge im Opium vor. Thebain ist eine tertiäre Base, die als Methyläther des Codeinons in seiner Enolform aufzufassen ist. Thebain krystallisiert aus verd. heißem Alkohol in farblosen Blättchen, aus hochprozentigem Alkohol in derben Prismen, die alkalisch reagieren. In Wasser ist es fast unlöslich, schwer löslich in Äther, leicht löslich dagegen in Alkohol, Chloroform und Benzol. Durch Kalilauge und Ammoniak wird es aus seinen Salzlösungen als Base ausgefällt; überschüssiges Ammoniak löst die Base wieder auf. Von seinen Salzen ist das Bitartrat und Salicylat schwer löslich in Wasser. — Schmelzpunkt  $193^{\circ}$ . Thebain dreht in seinen Lösungen das polarisierte Licht nach links.

ξ) **Eukodal** (Dihydrooxycodoinon); salzsaures Salz,  $C_{18}H_{21}NO_4 \cdot HCl$ : Durch Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd wird Thebain in schwefelsaurer Lösung in Oxycodoinon übergeführt. Das salzsaure Salz führt in der Arzneikunde den Namen Eukodal. Als salzsaures Salz einer tertiären Base fehlen ihm die Eigenschaften eines Phenols. Durch Ammoniak oder Alkalien wird eine Fällung der Base aus ihren Salzlösungen bewirkt. Die Base ist in Äther schwer, leicht dagegen in Chloroform löslich. — Schmelzpunkt der Base  $218-220^{\circ}$ , des salzsauren Salzes  $270^{\circ}$ . Für eine 5%ige wäßrige Lösung ist  $[\alpha]_D^{20} = -125^{\circ}$ .

o) **Narcein**,  $C_{23}H_{27}NO_8 + 3H_2O$ . Es ist das in geringster Menge im Opium vorkommende Alkaloid. Synthetisch kann es aus Narkotin hergestellt werden. Aus heißem Wasser krystallisiert Narcein mit 3 Mol. Krystallwasser in langen, weißen, glänzenden Büscheln, die einen schwach bitteren Geschmack besitzen und neutral reagieren. In Äther, Benzol und Petroläther ist Narcein unlöslich, in kaltem Alkohol, Amylalkohol und Chloroform schwer, leichter dagegen in diesen drei Lösungsmitteln in der Wärme löslich. Aus einer mit Ammoniak oder Natriumbicarbonat alkalisch gemachten wäßrigen Lösung seiner Salze ist es mit Chloroform, das 10% Alkohol enthält, in der Kälte ausschüttelbar. Narcein ist eine tertiäre Base mit zwei Methylgruppen und einer Carboxylgruppe. Infolge seines basischen und zugleich sauren Charakters kann es aus saurer oder stärker alkalischer Lösung nicht ausgeschüttelt werden. — Schmelzpunkt der lufttrockenen Krystalle  $165^{\circ}$ .

#### d) Ausmittlung und Trennung der Opiumalkaloide und deren Derivate.

Um die Anwesenheit von Opium festzustellen, wird vor allem versucht, die Mekonsäure (S. 1348) nachzuweisen. Ferner wird noch Morphin und das eine oder andere Alkaloid des Opiums, am besten Narkotin, zu identifizieren versucht.

Über die spezielle Isolierung des Morphins als solches s. S. 1352.

Die Ausmittlung der Opiumalkaloide erfolgt nach der Methode von STAS-OTTO. Hierbei findet sich ein Teil der Alkaloide in der Ausschüttelung der sauren, ein Teil in der natronalkalischen und der Rest in der ammoniakalischen oder natriumbicarbonatalkalischen Lösung vor. Auch die Unlöslichkeit oder Schwerlöslichkeit in diesem oder jenem Ausschüttelungsmittel wird hierzu mit angewendet.

Man verfährt am besten nach dem von GADAMER<sup>1</sup> aufgestellten Gang:

1. Leichenteile, Erbrochenes, Magen- und Darminhalt, Urin oder sonstige Objekte werden unter Zusatz von verd. Schwefelsäure bis zur schwach sauren Reaktion mit Alkohol ausgezogen und nach vorsichtiger Vertreibung des Alkohols aus dem Filtrat auf dem Wasserbade und weiterer Reinigung (S. 1322) ein schwach schwefelsaurer, wäßriger Auszug hergestellt, der dann mehrmals mit Äther ausgeschüttelt wird. In den Äther gehen außer färbenden Substanzen auch Spuren von Narkotin und Papaverin sowie Mekonin mit über.

<sup>1</sup> GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie.



2. Der saure, wäßrige Anteil wird durch Erwärmen vom Äther befreit und nun mit Amylalkohol mehrmals ausgeschüttelt. Von diesem Amylalkohol wird die Mekonsäure aufgenommen.

3. Der in der sauren, wäßrigen Lösung verbliebene Amylalkohol wird nun zunächst durch Ausschütteln mit Petroläther entfernt, dann die schwach schwefelsaure Lösung mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und nun durch Ausschüttelung mit Äther Papaverin, Thebain, Narkotin und Codein im wesentlichen der Lösung entzogen.

Um aus diesem Alkaloidgemisch das Narkotin abzutrennen, wird der Verdampfungsrückstand der in dem Äther in Lösung gegangenen Alkaloide in schwach mit Schwefelsäure angesäuertem Wasser aufgenommen, von ungelösten, harzigen Stoffen abfiltriert und die wäßrige Lösung solange mit gesättigter Natriumacetatlösung versetzt, bis keine Ausfällung mehr stattfindet. Als schwache Base werden hierdurch Narkotin und Papaverin abgeschieden, während Codein und Thebain in Lösung bleiben<sup>1</sup>.

4. Die abgeschiedenen Basen des Narkotins und Papaverins werden auf einer kleinen Nutsche gesammelt, ausgewaschen und wiederum in schwach schwefelsaurem Wasser gelöst. Die Lösung wird alkalisch gemacht und alsdann mit Benzol ausgeschüttelt, in dem Narkotin leicht und Papaverin schwer löslich ist.

5. Die Benzollösung läßt man auf dem Wasserbade bei geringer Temperatur verdunsten. Das Narkotin bleibt als nicht krystalline, harzige Masse zurück und kann aus Alkohol umkrystallisiert werden. Diese Krystalle dienen alsdann zum näheren Nachweis des Narkotins (S. 1354).

6. Die natronalkalische Lösung, der durch Petroläther das Narkotin, Papaverin, Thebain und Codein entzogen wurde, wird zunächst zur Entfernung der Verunreinigungen mit Chloroform ausgezogen, dann mit verd. Schwefelsäure angesäuert, mit Natriumbicarbonat schwach alkalisch gemacht und mehrmals mit heißem, alkoholhaltigem Chloroform ausgeschüttelt. Der Verdampfungsrückstand des Chloroformauszuges enthält das Morphin und wird nach weiterer Reinigung (S. 1353, unter Morphinnachweis) zum Nachweis benutzt. Spuren Narcein, die mit dem Morphin in Lösung gehen, sind für den Nachweis des Morphins bzw. des Opiums selbst belanglos. Die Spezialreaktionen auf Morphin und Narkotin s. S. 1353, 1354.

#### e) Isolierung des Morphins.

Da Morphin am meisten medizinische Anwendung findet, so ist auch die Zahl der Morphinvergiftungen nicht unerheblich.

Die bei dem analytischen Gang von STAS-OTTO nach der zweiten Ätherausschüttelung restierende natronalkalische, wäßrige Lösung wird nach vorherigem Ansäuern mit verd. Schwefelsäure entweder mit Ammoniak oder besser mit Natriumbicarbonat bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt. Ist Apomorphin zugegen, so ist die weinsaure Lösung nach STAS-OTTO grün gefärbt und wird beim Alkalisieren nach einiger Zeit rot. In diesem Falle schüttelt man zunächst mit Äther aus, in welchem Apomorphin löslich ist. Ist keine derartige Färbung zu beobachten, so schüttelt man am besten die erwärmte alkalische Lösung mit warmem Chloroform mehrmals aus. Nach KIPPENBERGER setzt man zweckmäßig dem Chloroform etwa  $\frac{1}{10}$  Teil Alkohol zu, jedoch ist hier die Gefahr vorhanden, daß mehr Verunreinigungsstoffe vom Chloroform gelöst werden. Auch warmer Amylalkohol kann zur Ausschüttelung verwendet werden. Da Morphin in Äther sehr schwer löslich ist, so läßt sich durch häufigere Ausschüttelung mit Äther, dem 1—1,5% Alkohol zugesetzt ist, Morphin ziemlich

<sup>1</sup> PLUGGE: Arch. Pharm. 1887, 343.

rein erhalten und wird auch von etwa vorhandenem Narcein frei sein, das nicht in den Äther mit übergeht. Eine weitere Reinigung kann durch Lösung in verd. Säure und erneutes Ausschütteln der Base erfolgen.

Über die Reaktionen auf Morphin s. unten.

Nach DRAGENDORFF und auch nach KIPPENBERGER soll Morphin nach der Einnahme im Organismus sich in Oxydimorphin umlagern, ein strikter Beweis hierfür ist jedoch nicht erbracht. MARQUIS und CLOETTA haben Verfahren ausgearbeitet, um auch das umgewandelte Morphin durch Rückverwandlung zum Nachweis zu bringen.

CLOETTA<sup>1</sup> verfährt in der Weise, daß man die in der Hackmaschine fein zerkleinerten Leichteile, Erbrochenes, Magen- oder Darminhalt innig mit Wasser durchmischt, mit Essigsäure ansäuert, aufkocht, und vom Ungelösten durch Abkolieren und spätere Filtration befreit. Die zurückbleibende Masse wird nochmals mit heißem Wasser, das etwas Essigsäure enthält, gut durchgemischt und wie vorhin von dem Ungelösten getrennt. Die vereinigten Filtrate werden mit Bleiessig gefällt, der Bleiessigniederschlag gesammelt und mit heißem Alkohol solange extrahiert, bis eine kleine Probe mit FRÖHDES Reagens keine Reaktion mehr gibt. Der so gewonnene Alkoholauszug enthält noch gelöstes Blei. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff wird das Blei gefällt und im Filtrat der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Durchsaugen von Luft verjagt. Der Alkohol, der essigsauer sein muß, wird auf dem Wasserbade bis auf etwa 200 ccm eingeengt und, um auch Spuren von Blei noch zu entfernen, erneut Schwefelwasserstoff eingeleitet und weiter behandelt wie vorher. Die Lösung wird nun auf etwa 20 ccm eingeengt, mit Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und mit heißem Chloroform oder Isobutylalkohol ausgeschüttelt. Nachdem Chloroform oder Isobutylalkohol sich geklärt haben, wird filtriert und die Lösung bei niedriger Temperatur langsam verdunstet. Den Rückstand nimmt man mit einem Gemisch von absol. Alkohol, Chloroform und Benzol (2:2:1) unter schwachem Erwärmen auf. Nach der Klärung, die bis zu 24 Stunden ausgedehnt werden muß, damit die Extraktivstoffe und sonstigen Verunreinigungen sich ausscheiden können, wird die Lösung filtriert, eingedunstet, der verbleibende Rückstand in wenig essigsauerm Wasser gelöst, nach vorheriger Filtration auf 2—3 ccm eingedampft und jetzt mit einigen Tropfen Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Wenn die Ausscheidung des Morphins nicht nach einigen Stunden erfolgt ist, so impft man mit einem Morphinkrystallstäubchen. Man kann den entstandenen Niederschlag auf einem kleinen Filterchen oder in einem Filtertiegel sammeln, mit etwa 2 ccm Wasser auswaschen, bei 100° trocknen und zur Wägung bringen oder das Morphin auch auf titrimetrischem Wege bestimmen.

Die in Salzsäure gelöste Base kann zum Identitätsnachweis benutzt werden.

MARQUIS säuert schwach mit Salzsäure an und erwärmt den Brei bis zu 5 Minuten auf dem siedenden Wasserbad zur Zerlegung des Oxydimorphins.

#### f) Reaktionen und sonstiges analytisches Verhalten der Opiumalkaloide.

**α) Morphin.** 1. Das isolierte Morphin muß die Reaktionen mit den allgemeinen Alkaloidreagenzien geben. Allerdings gibt Tannin nur eine schwache Trübung. Die Platin- und Golddoppelsalze sind ziemlich leicht löslich in Wasser. Auch der Schmelzpunkt des salzsauren Salzes, der jedoch nicht scharf ist, und die Linksdrehung seiner Lösung kann zur Identifizierung benutzt werden.

2. Konz. Salpetersäure löst Morphin mit blutroter Farbe, die allmählich in Gelb übergeht, auf. Setzt man der gelben Lösung ein Reduktionsmittel, Schwefelammonium oder Zinnchloridlösung, zu, so tritt eine violette Färbung auf (Unterschied von Brucin).

<sup>1</sup> CLOETTA: Arch. exper. Pathol. u. Pharmacol. 1903, 455.

3. **HUSEMANNsche Reaktion.** Löst man etwas Morphin in konz. Schwefelsäure, so tritt keine oder nur eine schwach rötliche Färbung auf. Wird eine derartige Lösung nun  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade in einem Uhrglase erwärmt — man kann auch das Uhrgläschen ganz kurz über einer kleinen Flamme bis zur Entwicklung weißer Dämpfe erhitzen —, so tritt eine rötlich bis braune Färbung auf. Setzt man nun nach völligem Erkalten einen Tropfen konz. Salpetersäure oder ein Körnchen Kaliumnitrat zu, so tritt zuerst eine rotviolette Färbung auf, die bald in Blutrot übergeht, später gelb wird und dann verblaßt. (Überführung in Apomorphin.)

4. **PELLAGRISCHE Reaktion.** Man löst auf einem Uhrglas eine Spur Morphin in konz. Salzsäure, fügt konz. Schwefelsäure zu und erwärmt das Uhrglas auf dem Wasserbade solange, bis die Salzsäuredämpfe entwichen sind, setzt dann das Erwärmen noch  $\frac{1}{4}$  Stunde fort. Der rotgefärbte Rückstand wird in 2—3 ccm Wasser gelöst und mit Natriumbicarbonat vorsichtig bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Fügt man alsdann einige Tropfen Jodtinktur zu, so entsteht eine smaragdgrüne Färbung. Ein Jodüberschuß ist, da er die Färbung verdeckt, zu vermeiden. Gibt man die Lösung in ein Reagensglas und schüttelt mit Äther durch, so färbt sich der Äther rot, während die wäßrige Lösung die grüne Färbung behält. (Überführung in Apomorphin.)

5. **FRÖHDEs Reagens** gibt eine violette Farbe, die über Blau und Grün in schwaches Rot übergeht. Ziemlich charakteristisch.

6. **MARQUIS' Reagens** gibt eine purpurrote Färbung, die von Violett in Blau übergeht. Apomorphin, Narkotin, Papaverin und Codein geben eine ähnliche Farbreaktion. Schärfe 1:25000.

7. Erwärmt man eine wäßrige Morphinsalzlösung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, so tritt Braunfärbung und Abscheidung von Silber ein.

8. **Eisenchloridprobe.** Infolge seines Phenolcharakters geben Morphinsalze in neutraler Lösung mit 1—2 Tropfen Eisenchloridlösung eine blaue Färbung. Man kann auch eine Mischung von etwas Eisenchlorid und Ferricyankali zusetzen. Es tritt infolge Reduktion des Ferricyankalis eine Blaufärbung, Berlinerblau, auf.

9. **Jodsäureprobe.** Wird eine schwach schwefelsaure Morphinlösung mit etwas Jodsäure versetzt, so tritt eine schwache Gelbfärbung der Lösung durch ausgeschiedenes Jod ein. Schüttelt man die wäßrige Lösung mit einigen Tropfen Chloroform durch, so sind die sich abscheidenden Chloroformtröpfchen violett gefärbt.

10. **Uransalzprobe.** Fügt man zu einer kleinen Menge der freien Base einige Tropfen reinen Methyl- oder Äthylalkohol und einen kleinen Krystall Uranylнитrat, so entsteht nach dem Umrühren eine rotgefärbte Lösung. Ist viel Morphin vorhanden, so scheidet sich Morphinurat aus, das bei weiterem Zusatz von Uranylнитrat wieder verschwindet. Die Reaktion zeigt die Anwesenheit freier Phenolgruppen an.

Oxydimorphin gibt mit **MARQUIS' Reagens** gelb-rote Färbung. Mit konz. Schwefelsäure und Rohrzucker tritt Blaufärbung ein, die in Grün übergeht. Morphin wird rot.

**Physiologischer Versuch.** Eine kleine Menge des salzsauren Morphins wird in einigen Tropfen physiologischer Natriumchloridlösung gelöst und einer weißen Maus unter die Rückenhaut gespritzt. Schon nach wenigen Minuten tritt die typische S-Stellung des Schwanzes ein. Der Gang des Tieres ist erschwert, was auf Lähmungserscheinungen der Hinterbeine beruht. Das Tier zeigt starke Erregungserscheinungen. Außer Morphin bewirken Codein, Dionin, Thebain usw. ähnliche Auslösungen.

Die quantitative Bestimmung des Morphins kann entweder gewichtsanalytisch oder titrimetrisch erfolgen. Siehe unter Alkaloidbestimmung S. 1340. Im Harn finden sich bei Einnahme von Morphin geringe Mengen desselben an Glucuronsäure gebunden vor.

Zu bemerken ist noch, daß auch Morphin-Ptomaine mit starker Reduktionswirkung bekannt sind. Durch genügende Reinigung des Alkaloids lassen sie sich entfernen. Diese Ptomaine geben nicht die anderen Morphinreaktionen.

β) **Narkotin.** Über die Eigenschaften s. S. 1350. Narkotin kann im **STAS-OTTO**-schen Verfahren schon in saurer Lösung durch Lösungsmittel ausgeschüttelt werden.

1. Konz. Schwefelsäure färbt Narkotin grünlichgelb. Die Färbung geht in Gelbrot über, und nach einigen Tagen wird die Lösung himbeerrot. Verd. Schwefelsäure färbt Narkotin nach dem Verdunsten auf dem Wasserbade rotgelb; erwärmt man den Rückstand stärker, so tritt eine carmoisinrote Färbung auf; wenn die überschüssige Schwefelsäure zu verdampfen beginnt, bilden sich am Rande blauviolette Streifen. Allmählich geht die Farbe der ganzen Lösung in Rotviolett über (**DRAGENDORFF**).

2. FRÖHDES Reagens ruft eine blaugrüne, dann grüne und zuletzt rötlichgelbe Färbung hervor. Wendet man konz. FRÖHDESSCHES Reagens an, so löst dieses Narkotin mit grüner Farbe, die in schönes Kirschrot übergeht. (Reagens 0,05 g Ammoniummolybdat + 1 ccm konz. Schwefelsäure.)

3. Reaktion von WANGERIN. Fügt man zu einer Narkotininlösung, 0,01 in 20 Tropfen konz. Schwefelsäure, 1—2 Tropfen einer konz. Saccharoselösung und erwärmt die Lösung 1 Minute lang unter Umrühren auf einem kochenden Wasserbade, so geht die grünlichgelbe Färbung über eine braune, braunviolette in eine intensiv blauviolette Färbung über, die sich einige Stunden hält.

4. Reaktion von COUVERBE. Setzt man zu einer Lösung von Narkotin in konz. Schwefelsäure nach etwa 2 Stunden eine Spur Salpetersäure, so tritt eine Rotfärbung ein, die nach einiger Zeit noch intensiver wird. Das Reagens nach ERDMANN löst eine ähnliche Reaktion aus.

γ) **Papaverin.** Im analytischen Gang nach STAS-OTTO kann das Papaverin aus der sauren Lösung mittels Chloroform ausgeschüttelt werden. Allgemeine Eigenschaften s. unter Papaverin S. 1350.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure löst Papaverin ohne Färbung auf. Nach längerem Erhitzen tritt eine schwache Blauviolett färbung auf.

2. Konz. Schwefelsäure ruft eine Gelbfärbung hervor.

3. FRÖHDES Reagens wird in der Kälte grün, in der Wärme blau gefärbt.

4. Konz. Schwefelsäure, die in 10 ccm 1 Tropfen Eisenchloridlösung enthält, färbt Papaverin beim Erwärmen blau bis blaurot.

5. MECKES Reagens färbt Papaverin in der Kälte grünlich, dann dunkelstahlblau. In der Wärme geht die Färbung in Dunkelviolett über.

6. MARQUIS' Reagens ruft eine schwache Rosafärbung hervor, die allmählich dunkel violettrot wird.

δ) **Thebain.** Es läßt sich infolge seiner stark basischen Eigenschaften nur in natronalkalischer Lösung durch Lösungsmittel ausschütteln. Am geeignetsten ist Chloroform. Allgemeine Eigenschaften s. unter Thebain S. 1351.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure ruft eine blutrote Färbung hervor, die langsam gelbrot wird. Ähnliche Reaktionen geben FRÖHDES, MANDELINS und ERDMANN'S Reagens.

2. MECKES Reagens bewirkt in der Kälte eine tief orangefarbene Farbe, die bald verschwindet.

3. MARQUIS' Reagens gibt gelbrote bis braune Färbung.

ε) **Narcein.** Es läßt sich am besten in schwach ammoniakalischer oder natriumbicarbonatalkalischer Lösung zusammen mit Morphin ausschütteln. Die Trennung von Morphin kann nach KIPPENBERGER<sup>1</sup> mittels der verschiedenen Löslichkeit der gerbsauren Salze in schwach salzsaurer Lösung durchgeführt werden.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure färbt Narcein gelb. Die Gelbfärbung geht nach einigen Stunden in eine blutrote über; schneller bildet sich die Rotfärbung durch Erwärmen.

2. Konz. Salpetersäure ruft gelbliche Färbung hervor.

3. FRÖHDES Reagens löst Narcein mit braungrüner Farbe, die allmählich in Grün und schließlich in Rot übergeht.

4. Jodwasser färbt festes Narcein blau. Morphin verhindert oder beeinträchtigt die Farbe erheblich.

5. ERDMANN'S Reagens löst Narcein mit gelber Farbe, beim Erwärmen wird die Farbe dunkelorange.

6. Resorcin-Schwefelsäure. Wird etwa 0,01 g Resorcin mit einigen Tropfen Schwefelsäure verrieben und setzt man alsdann der intensiv gelbgefärbten Lösung unter Umrühren auf dem kochenden Wasserbade eine Spur Narcein zu und erwärmt, so tritt eine carmoisinrote bis kirschrote Färbung ein. Beim Erkalten geht die Färbung in Orangegelb über.

7. Chlorwasserreaktion. Wird Narcein mit Chlorwasser übergossen und etwas Ammoniak zugesetzt, so tritt eine tiefrote Färbung auf.

8. Tannin-Schwefelsäure. Erhitzt man eine Spur Narcein, etwa 0,005 g mit etwas Tannin, etwa 0,01 g, und 10 Tropfen konz. Schwefelsäure auf dem Wasserbade unter Umrühren, so nimmt die erst gelbbraune Lösung einen rein grünen Farbenton an. Erwärmt man länger, so schlägt die Farbe über einen blauen Farbenton in schmutziges Grün um. Ähnliche Reaktion geben Narkotin und Hydrastin.

<sup>1</sup> KIPPENBERGER: Grundlagen für den Nachweis von Giftstoffen.

ζ) **Apomorphin.** Ist Apomorphin zugegen, so sind die wäßrigen Auszüge nach STAS-OTTO grün gefärbt und nehmen bei einigem Stehen an der Luft nach Zusatz von Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion eine blutrote Farbe an. Die Ätherauszüge sind bei Gegenwart von Apomorphin blutrot oder violettrot gefärbt. Apomorphin ist aus der ammoniakalischen oder natriumbicarbonatalkalischen Lösung mit Äther ausschüttelbar.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure löst Apomorphin ohne Färbung auf. Fügt man der Lösung eine Spur Salpetersäure zu, so tritt eine vorübergehende violette Färbung ein, die in Blutrot und dann in Gelbrot übergeht. Konz. Salpetersäure allein ruft eine violettrote, dann rotbraune und schließlich braunrote Färbung hervor.

2. MARQUIS Reaktion. Auf Zusatz dieses Reagenzes entsteht eine schnell vorübergehende Violett färbung, die alsdann schwarzgrün wird.

3. Eisenchlorid ruft eine völlig blaue Färbung hervor, die violett und endlich schwarz wird. Morphin wird blau, Codein, Dionin und Heroin geben braune Färbung.

4. WANGERINSche Reaktion. Die Lösung von salzsaurem Apomorphin wird mit etwa 4 Tropfen einer 0,1%igen Kaliumbichromatlösung versetzt und dann 1 Minute geschüttelt. Es tritt eine dunkelgrüne Färbung auf. Schüttelt man dieses Gemisch mit einigen Kubikzentimetern Essigäther, so wird dieser schön violett gefärbt. Setzt man nun einige Tropfen einer 1%igen Zinnchlorürlösung zu, so wird nach dem Umschütteln der Essigäther grün, nach Zusatz von Bichromatlösung wieder violett gefärbt.

5. FEINBERGSche Reaktion<sup>1</sup>. Wird salzsaures Apomorphin in ziemlich viel Wasser gelöst und alsdann mit einigen Tropfen einer 1%igen Ferricyankaliumlösung versetzt und mit 1 ccm Benzol gut geschüttelt, so färbt sich das Benzol amethystfarben und wird auf Zusatz von einigen Tropfen verd. Natriumbicarbonatlösung nach dem Umschütteln zuerst violettrot und dann violett gefärbt. Die Reaktion ist sehr scharf und wird durch andere Opiumalkaloide nicht gehindert.

6. Ammoniakalische Silbernitratlösung wird von Apomorphin, zum Unterschied von Morphin, Codein, Dionin und Heroin, bereits in der Kälte reduziert.

η) **Euporphin.** Es kann als quaternäre Base in saurer und alkalischer, bzw. natriumbicarbonatalkalischer Lösung nicht ausgeschüttelt werden (Unterscheidung von Apomorphin). Die Isolierung kann durch Extraktion des nach STAS-OTTO erhaltenen, mit Seesand vermischten Abdampfrückstandes mittels Alkohol vorgenommen werden.

Das Euporphin gibt die gleichen Reaktionen, bzw. gleicht in seinen Reaktionen dem Apomorphin. Durch Jodlösung wird es braungelb gefärbt.

θ) **Morphosan** ist eine quaternäre Base, die infolgedessen nach STAS-OTTO die gleiche Ausschüttelungsunmöglichkeit bietet wie das Euporphin. Deshalb ist auch hier die Eintrocknung mit Seesand und Extraktion mit Alkohol vorzunehmen.

Morphosan gibt die meisten Reaktionen, die auch das Morphin aufweist. Es macht aus Jodsäure Jod frei und färbt Eisenchloridlösung blau, die PELLAGRISChe Reaktion tritt nicht ein. FRÖHDES Reagens ruft eine direkt eintretende schöne violette Färbung hervor, die sehr bald schmutzig grün und später braun wird.

ι) **Heroin.** Es spaltet leicht seinen Acetylrest ab und wird infolgedessen in Morphin zurückverwandelt und als solches im Gang nach STAS-OTTO gefunden. Aus ganz schwach alkalischer Lösung kann es unter Umständen mit Äther oder Chloroform unverändert ausgeschüttelt werden. Da seine Hydroxylgruppen besetzt sind, so kann es nicht, wie z. B. Morphin, Reaktionen auf Phenol geben, wenn aber eine Verseifung vorhergeht und die Hydroxylgruppen frei werden, so treten dann alle die Reaktionen ein, die für Morphin charakteristisch sind.

Reaktionen. 1. Konz. Salpetersäure gibt mit einer Spur Heroin eine gelbgefärbte Lösung. Erwärmt man das Gemisch auf einem Uhrglase schwach, so entsteht sofort eine Grünblaufärbung, die von der Mitte zum Rande fortschreitet. Die Färbung verblaßt nach einiger Zeit und es tritt wieder die Gelbfärbung ein.

2. Hexamethylentetramin, in geringer Menge in 5%iger Schwefelsäure gelöst, färbt Heroin goldgelb, dann safrangelb und zuletzt dunkelblau. Morphin wird sofort violettblau.

3. Wenn genügend Heroin vorliegt, so erwärmt man es mit konz. Schwefelsäure und einigen Tropfen Alkohol; es muß alsdann ein Essigäthergeruch auftreten.

<sup>1</sup> FEINBERG: Zeitschr. physiol. Chem. 1912, 84, 363.

\*) **Codein**. Es findet sich nach dem Gang von STAS-OTTO in der alkalischen Ätherausschüttelung. Da die Phenolgruppe durch eine Methylgruppe besetzt ist, so gibt es zum Unterschied von Morphin nicht die Reaktionen, die die Phenolgruppen als solche charakterisieren. Es macht aus Jodsäure kein Jod frei, Eisenchlorid wird nicht blau gefärbt.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure färbt Codein in der Kälte nicht. Beim Erwärmen wird die Lösung schwach rötlich-blau.

2. Konz. Salpetersäure färbt Codein gelb.

3. ERDMANN'S Reagens bewirkt in der Kälte keine Färbung, in der Wärme wird die Lösung blau.

4. MANDELIN'S Reagens ruft eine grüne, dann blau werdende Färbung hervor.

5. MECKE'S Reagens färbt Codein in der Kälte smaragdgrün, bei längerem Stehen geht die Farbe in Stahlblau über und ist in der Wärme beständig.

6. MARQUIS' Reagens löst Codein mit rötlichvioletter Farbe, die bald in Blauviolett übergeht und lange anhält. Es findet, im Spektralapparat betrachtet, eine Auslöschung in Orange und Gelb statt.

7. Die Reaktion mit Saccharose und konz. Schwefelsäure führt man in der Weise aus, daß man etwas Codein in konz. Schwefelsäure löst und 2—3 Tropfen konz. Saccharoselösung zusetzt und gelinde erwärmt. Es tritt eine purpurrote Färbung ein.

8. PELLAGRISCHES Reaktion. Sie ist in gleicher Weise auszuführen, wie unter Morphin beschrieben; es entstehen dieselben Farbtöne, da es eine Apomorphinreaktion ist.

In der Literatur ist auch Leichencodein erwähnt; die PELLAGRISCHE Reaktion gab es nicht.

λ) **Eukodal** ist aus natronalkalischer Lösung im Gang nach STAS-OTTO ausschüttelbar. Es gibt die Reaktionen nicht, die auf eine Phenolgruppe schließen lassen.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure und ERDMANN'S Reagens geben keine Färbung.

2. Salpetersäure färbt gelb.

3. MARQUIS' Reagens färbt gelb, braun und über violett rot.

μ) **Dicodid** findet sich im Gang nach STAS-OTTO in der natronalkalischen Ätherausschüttelung.

MARQUIS-Reagens färbt gelb, später schwach rotviolett.

Eisenchlorid gibt keine Reaktion. Jodsäure wird nicht reduziert.

ν) **Dionin und Peronin** finden sich auch im STAS-OTTOSCHEN Gang in der natronalkalischen Ausschüttelung, s. die Tabelle S. 1365, 1366.

Reaktionen: MECKE'S Reagens färbt Dionin olivengrün, die Farbe geht beim Erhitzen in Blaugrün, dann Blau über. Peronin wird rot.

MARQUIS' Reagens färbt grün.

MECKE'S Reagens färbt Peronin olivengrün; nach dem Erwärmen ändert sich die Farbe nicht.

## 10. Cytisin, $C_{11}H_{14}N_2O$ .

Im Samen, den Blättern und Schoten des Goldregens, *Cytisus laburnum*, einer Papilionacee, findet sich ein Alkaloid, das Cytisin, welches zu den Krampfgiften gehört. Es ist eine sekundäre einsäurige Base von stark alkalischer Reaktion, die große prismatische Krystalle bildet, welche ohne Zersetzung sublimieren. In Wasser, Alkohol, Chloroform und Essigäther ist es leicht löslich. Die Löslichkeit in Äther ist sehr gering. Das Cytisin ist in natronalkalischer Lösung durch Chloroform ausschüttelbar. — Schmelzpunkt 152—153°;  $[\alpha]_D^{20}$  — 119,6°.

Reaktionen. 1. VAN DE MOERSCHES Reaktion<sup>1</sup>: Eisenchlorid färbt Cytisin blutrot. Durch Zusatz einiger Tropfen Wasserstoffsperoxydlösung verschwindet die blutrote Farbe. Wird alsdann die Mischung auf dem Wasserbade erwärmt, so tritt die blaue Farbe wieder auf. Die Reaktion gelingt am besten, wenn man auf 8 mg Cytisin 0,2 ccm Eisenchloridlösung (5%) und 2—5 ccm 0,5% Wasserstoffsperoxydlösung anwendet.

## 11. Physostigmin und 12. Eseridin.

In der Calabarbohne (*Physostigma venenosum*), einer Papilionacee, finden sich neben anderen Alkaloiden das Physostigmin und Eseridin vor.

<sup>1</sup> MOER: Arch. Pharm. 1891, 57.

**Physostigmin**,  $C_{15}H_{21}N_3O_2$ , ist eine einsäurige Base von alkalischer Reaktion. Aus Benzollösung scheiden sich rhombische Krystalle ab. Die Base kann im Gang nach STAS-OTTO aus der schwach natronalkalischen Lösung durch Äther, Benzol oder Chloroform ausgeschüttelt werden, besser aber ist es, ihrer leichten Zersetzlichkeit wegen, die Base aus natriumbicarbonathaltiger Lösung auszuschütteln. Aus demselben Grunde stellt man die Auszüge mit weinsäurehaltigem Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur und im Dunkeln her und dampft dieselben im Vakuum ein. Die Base ist leicht löslich in Alkohol. Schmelzpunkt  $105^\circ$ . Physostigmin dreht das polarisierte Licht nach links.

Reaktionen. 1. Wenn die Base aus ihren Salzen durch viel Natronlauge in Freiheit gesetzt wird, so zersetzt sie sich und färbt die Lösung rot.

2. Die schwach schwefelsaure Lösung scheidet auf Zusatz einer Spur Jodsäure kein Jod aus. Wird die Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt, so bleibt dasselbe ungefärbt.

Das Alkaloid bewirkt Verengung der Pupillen.

**Eseridin**,  $C_{15}H_{23}N_3O_3$ , bildet farblose Tetraeder. In Wasser ist die Base unlöslich, etwas leichter löslich in Alkohol, Äther und Benzol, leicht löslich in Chloroform. Das Eseridin ist lichtbeständig. Beim Erhitzen mit verdünnten Säuren geht es in Physostigmin über. — Schmelzpunkt  $132^\circ$ .

Reaktionen. Eseridin gibt beim Versetzen mit Jodsäure oder Kaliumjodat in schwefelsaurer Lösung an Chloroform Jod ab. Es tritt eine Reduktionswirkung ein, Unterscheidung von Physostigmin.

Eseridin ruft Pupillenverengung hervor. Die Wirkung ist schwächer als die des Physostigmins.

### 13. Pilocarpin, $C_{11}H_{16}N_2O_2$ .

In den Blättern von *Pilocarpus pennatifolius*, einer Rutacee, findet sich neben anderen Alkaloiden das Pilocarpin (s. nebenstehende Formel), eine tertiäre Base. Die Base ist schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther, Chloroform; sie krystallisiert sehr schwierig und wirkt auf die Pupille verengernd. — Schmelzpunkt des Chlorids  $193-196^\circ$ , des Pikrats  $159$  bis  $160^\circ$  (aus Alkohol krystallisiert);  $[\alpha]_D$  des Chlorids  $+91^\circ$ .

Im Gang nach STAS-OTTO kann die Base ihrer Lactongruppe wegen nicht aus natronalkalischer Lösung ausgeschüttelt werden. In natriumbicarbonathaltiger Lösung läßt sich die Base mit Chloroform ausschütteln.

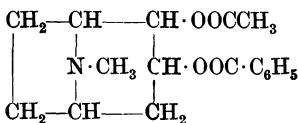
Reaktionen. 1. Die Base löst sich in konz. Säuren ohne Farberscheinung.

2. Wird etwas Pilocarpin in 1 ccm Wasser gelöst, mit 3 Tropfen einer 2%igen Nitroprussidlösung und 3 Tropfen 1,0 N.-Natronlauge versetzt, so tritt, wenn man die Lösung nach wenigen Minuten ansäuert, eine weinrote Färbung ein. Setzt man einige Tropfen Natriumthiosulfatlösung zu, so wird nach einiger Zeit die Lösung graugrün. Auf vorsichtigen Zusatz von Wasserstoffsperoxyd tritt eine carminrote Färbung auf. Apomorphin gibt die gleiche Reaktion.

3. Fügt man zu etwas Pilocarpin im Reagensglas ein Kryställchen Kaliumdichromat und 1-2 ccm Chloroform und schüttelt mit konz. Wasserstoffsperoxydlösung kräftig durch, so geht in das Chloroform ein blauer Farbstoff über. Die Flüssigkeit verblaßt allmählich. Apomorphin und Strychnin verhalten sich ähnlich.

### 14. Cocain (Methylbenzoylkonin), $C_{17}H_{21}NO_4$ .

In den Blättern des *Cocastreches* (*Erythroxylon Coca*) befindet sich neben andern Alkaloiden das Cocain. Es bildet große, farblose, stark alkalisch reagierende, vier- bis sechsseitige, monokline Prismen, die einen bitterlichen Geschmack besitzen und die Zungenspitze unempfindlich machen. Mit Säuren gibt die Base Salze. Durch Erhitzen mit verd. Säuren spaltet Cocain Benzoesäure und Methyl-



alkohol ab und geht in Ekgonin über. Durch Kochen mit Wasser spaltet sich nur die Methylgruppe ab, und es bildet sich Benzoyl ekgonin. Die Base kann aus natronalkalischer Lösung mit Äther, Benzol oder Chloroform ausgeschüttelt werden. — Schmelzpunkt  $98^{\circ}$ , Pikrat  $165\text{--}166^{\circ}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ :  $-16,4^{\circ}$ .

Nachweis. Dieser ist vielfach unmöglich, da Cocain im Organismus sehr schnell in Ekgonin gespalten wird, dessen Isolierung wohl kaum gelingen dürfte. Größere Mengen können wohl noch im Magen- und Darminhalt gefaßt werden.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure, konz. Salpetersäure, ERDMANNs Reagens, FRÖHDES- und MANDELINS-Reagens geben mit Cocain keine Färbung.

2. Reaktion mit gesättigter Kaliumpermanganatlösung. Man löst die Base in etwas verd. Salzsäure und verdunstet die Lösung auf dem Wasserbade. Der Rückstand wird in sehr wenig Wasser gelöst, fügt man dann einige Tropfen gesättigter Kaliumpermanganatlösung zu, so fällt violett gefärbtes Cocainpermanganat krystallin aus.

3. Reaktion mit Chromsäure. Setzt man einer Cocainsalzlösung, die nicht zu verdünnt sein darf, tropfenweise 5%ige Chromsäure zu, so ruft jeder einfallende Tropfen einen Niederschlag hervor, der sich beim Umschütteln jedoch löst.

4. Eine Mischung von salzsaurem Cocain und Quecksilberchlorür färbt sich beim Befeuchten mit verd. Alkohol und schwachem Erwärmen grau.

5. Nachweis der Benzoylgruppe. Zu dieser Reaktion benötigt man 0,2 g Cocain, dasselbe wird in einem Reagensglase in etwa 2 ccm konz. Schwefelsäure gelöst und einige Minuten im kochenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Abkühlen fügt man tropfenweise Wasser hinzu. Es bildet sich ein krystalliner Niederschlag, der aus Benzoesäure besteht. Die Benzoesäure kann man mit Äther ausschütteln. Vorher schüttelt man zur Entfernung der Schwefelsäure zweimal mit Wasser aus. Der nach dem Verdunsten des Äthers verbleibende Rückstand zeigt direkt oder nach der Umkrystallisation einen Schmelzpunkt von  $120^{\circ}$ .

6. Benzoesäuremethylesterbildung. Verreibt man etwas Cocain mit Quecksilberchlorür und haucht eine Spur Alkohol auf, so tritt Grünfärbung und Abscheidung von Quecksilber ein. Wird die Mischung auf dem Wasserbade erhitzt, so tritt der typische Geruch des Benzoesäuremethylesters auf.

Cocainsalzlösung erzeugt, in die Augen geträufelt, eine Erweiterung der Pupillen. Auf die Zungenspitze gebracht, wird Gefühllosigkeit hervorgerufen.

### 15. Tropicocain (Benzoylpseudotropin) $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}$ .

Ein weiteres Alkaloid der Cocablätter ist das Tropicocain. Es bildet stark alkalisch reagierende Tafeln, die in Wasser schwer löslich, in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol jedoch leicht löslich sind. Durch Alkali wird die Base in Freiheit gesetzt und kann mit Äther ausgeschüttelt werden. Schmelzpunkt  $49^{\circ}$ , des Pikrats  $240\text{--}242^{\circ}$  (Schwärzung bei  $215\text{--}220^{\circ}$ .)

Nachweis. Die Base läßt sich nach Alkalisieren der wäßrigen Lösung mit Äther ausschütteln. Das Tropicocain gibt ähnliche Reaktionen wie das Cocain. Beim Erhitzen mit Salzsäure spaltet sich Benzoesäure ab.

Kaliumdichromatreaktion. Setzt man einer etwa 0,5%igen Tropicocainlösung eine 20%ige Kaliumdichromatlösung zu, so entsteht direkt ein dicker, krystalliner Niederschlag, der sich beim Erwärmen ziemlich schwer löst und nach dem Erkalten in derben Krystallen ausscheidet. Cocain gibt auf Zusatz von Kaliumdichromat erst nach dem Ansäuern einen harzartigen Niederschlag.

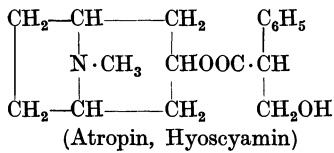
Dem Tropicocain kommt eine anästhesierende Wirkung zu.  
Synthetische Ersatzpräparate des Cocains s. S. 1372.

### 16. Atropin, $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ .

In der roten Kirsche und dem Samen der Tollkirsche (*Atropa belladonna*), einer Solanacee, und auch in der Wurzel und den Blättern findet sich das Atropin. Auch im Stechapfel und dem Bilsenkraut kommt neben anderen Alkaloiden Atropin vor. Dem Atropin ist das Hyoscyamin (S. 1360) isomer. Das



Atropin ist ein Derivat der r-Tropasäure, während Hyoscyamin das Derivat der l-Tropasäure ist. Ihnen kommt die nebenstehende Formel zu.



Das Atropin ist inaktiv, während das Hyoscyamin linksdrehend ist. Atropin bildet farblose, glänzende, säulenförmige oder spießartige Kristalle oder glänzende Nadeln. Die alkalisch reagierende Base ist in kaltem Wasser wenig löslich, in heißem ist die Löslichkeit größer.

In Alkohol, Chloroform und Amylalkohol ist es leicht, in Äther und Benzol schwer löslich. Aus natronalkalischer Lösung, besser aus natriumbicarbonathaltiger Lösung, ist Atropin nach STAS-OTTO mit Äther, Benzol oder Chloroform ausschüttelbar. — Schmelzpunkt 115—115,5°, des Goldsalzes 135—137°, des Pikrats 176—177°. Atropin ist optisch inaktiv, das Handelsatropin dreht schwach links infolge seiner Verunreinigung mit Hyoscyamin.

Nachweis. Nach Ansicht von IPSEN soll sich das Atropin noch nach längerer Zeit in Leichenteilen nachweisen lassen. In dem Harn wird Atropin wieder ausgeschieden. Magen- und Darminhalt und Erbrochenes sind auf Fragmente der Tollkirsche zu untersuchen. Ein isoliertes Samenkorn genügt, um nach Ausziehen die pupillenerweiternde Eigenschaft festzustellen. Nach dem Gang von STAS-OTTO findet sich das Atropin in der natronalkalischen Ausschüttelung. Besser ist es, die Base durch Natriumbicarbonat in Freiheit zu setzen, da Natronlauge zu leicht eine Verseifung hervorruft. Die Alkaloidreagenzien geben gute Niederschläge. Auch das Goldsalz und das Pikrat können zur Identifizierung herangezogen werden.

Reaktionen. 1. VITALISCHE Reaktion: Wird etwas Atropin in einem Schälchen auf dem Wasserbade mit einigen Tropfen rauchender Salpetersäure eingedampft, so bleibt ein gelblich gefärbter Rückstand, der mit alkoholischer Kalilauge befeuchtet, violett wird.

2. Erhitzt man in einem kleinen Reagensglase wenig Atropin bis zum Auftreten weißer Nebel, so tritt ein Geruch nach Schlehenblüten auf. Setzt man alsdann 1 ccm konz. Schwefelsäure zu und erwärmt erneut bis zur Bräunung, so tritt auf Zusatz von etwa 2 ccm Wasser der Geruch nach Schlehenblüten kräftiger hervor.

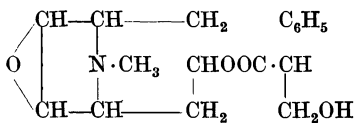
Physiologischer Versuch. Eine Spur Atropin wird in einigen Tropfen stark verd. Salzsäure gelöst und einer Katze in das Auge geträufelt. Es tritt eine Erweiterung der Pupille ein, die längere Zeit, bis zu 8 Tagen, anhalten kann.

### 17. Hyoscyamin, $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ .

Dieses Alkaloid kommt im Samen und den Blättern von Hyoscyamusarten neben einem zweiten Alkaloid, dem Scopolamin, vor, die zu den Solanaceen gehören. Die chemische Verwandtschaft zum Atropin wurde bereits (S. 1359) besprochen. In seinen Eigenschaften und seinen Reaktionen verhält es sich wie Atropin. Es bildet farblose, glänzende Nadeln. Die Wirkung ist auf das Auge weniger anhaltend als beim Atropin. — Schmelzpunkt 108,5°, des Goldsalzes 160—162°, des Pikrats 161—163°;  $[\alpha]_D - 23,07^\circ$ . Die VITALISCHE Reaktion und der Schlehenblütengeruch nach der Verseifung ist identisch mit dem des Atropins. Auch kommt ihm eine geringere physiologische Wirkung als dem Atropin zu.

### 18. Scopolamin, $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Das Scopolamin befindet sich in den Mutterlauge bei der Hyoscyamin-gewinnung. Auch der Samen des Stechapfels (*Datura stramonium*) enthält Scopolamin. Es kommt ihm nebenstehende Formel zu:



Das Scopolamin gleicht in seinen chemischen Eigenschaften und seiner Löslichkeit dem Atropin. Es bildet schwer kristallisierbare

Nadeln und bleibt meist bei der Isolierung als Sirup zurück. — Schmelzpunkt  $59^{\circ}$ , des Goldsalzes  $210\text{--}214^{\circ}$ , inaktive Form  $208^{\circ}$ , des Pikrats  $190$  bis  $191^{\circ}$ . Das Scopolamin dreht das polarisierte Licht nach links. Durch Einwirkung von Natronlauge wird die Linksdrehung aufgehoben. Die VITALISCHE Reaktion und die Verseifung ergeben gleiches wie beim Atropin. Physiologisch ist die Wirkung geringer als die des Atropins.

### 19. Homatropin, $C_{16}H_{21}NO_3$ .

Homatropin ist der Tropinester der Mandelsäure und wird synthetisch hergestellt. Es kommen ihm die gleichen Eigenschaften wie dem Atropin zu; es ist aus alkalischer Lösung ausschüttelbar; das Homatropin bildet farblose, hygroskopische Prismen. — Schmelzpunkt  $93,5\text{--}98,5^{\circ}$ .

Die Reaktion nach VITALI ist gleich der des Atropins. Beim Erwärmen mit verd. Schwefelsäure tritt ein Geruch nach Benzaldehyd auf. Homatropin wirkt auf das Auge wie Atropin, die Wirkung hält jedoch nur  $12\text{--}24$  Stunden an.

### 20. Strychnin, $C_{20}H_{22}ON_2CO$ .

In den Samen verschiedener Strychnos-Arten finden sich die beiden Alkaloide Strychnin und Brucin. Die wichtigste Strychnin und Brucin liefernde Pflanze ist *Strychnos nuxvomica*, deren flache Samen die stark bitteren Alkaloide enthalten. Beide Alkaloide sind einsäurige tertiäre Basen, die in Wasser kaum löslich sind, leichter in heißem Alkohol, Äther und Benzol, leicht in Chloroform. Die Krystalle des Strychnins bilden rhombische Prismen von intensiv bitterem Geschmack, der noch in einer Verdünnung  $1:50,000$  bemerkbar ist. — Schmelzpunkt des Strychnins  $265\text{--}268^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -114,7^{\circ}$ .

Nachweis: Im Magen- und Darminhalt sowie Erbrochenem kann man nach Fragmenten des Samens fahnden. Nach dem Gang von STAS-OTTO ist Strychnin in natronalkalischer Lösung durch Äther oder Chloroform ausschüttelbar. Die Base bleibt meist schon krystallin beim Abdunsten des Lösungsmittels zurück. Durch nochmaliges Lösen in verd. Säure und erneutes Ausschütteln aus alkalischer Lösung läßt sie sich meist schön krystallin erhalten. In der Regel wird das salpetersaure Salz verwendet. Da das Strychnin sich im Darm umsetzt und nur etwa  $\frac{1}{10}$  des einverleibten Giftes wieder gefunden wird, so ist es ratsam, Magen- und Darminhalt getrennt zu untersuchen. Strychnin erhält sich sehr lange in Leichenteilen, selbst noch nach Monaten läßt es sich nachweisen. Man kann nach WELBORN auch in der Weise verfahren, daß man die Leichenteile mit einer Lösung auszieht, die aus drei Teilen essigsäurehaltigem Wasser und 1 Teil Alkohol besteht. Die Extraktion wird bei  $60^{\circ}$  während drei Stunden durchgeführt. Das Filtrat muß deutlich sauer reagieren. Vor dem Eindampfen bis zum dünnen Sirup ist es zweckmäßig, die Lösung mit Petroläther auszuschütteln, um das Fett zu lösen. Den Sirup übergießt man mit Chloroform und fügt so viel entwässerte Soda zu, bis eine pastenartige Masse entsteht, die mit Chloroform durchgeknetet wird. Nach dem Verdunsten der Chloroformlösung bleibt fast rein weißes Strychnin zurück.

Reaktionen. 1. Konz. Schwefelsäure, ERDMANN'S- und FRÖHDE'S-Reagens lösen reines, brucinfreies Strychnin farblos auf. Konz. Salpetersäure löst Strychnin mit gelber Farbe auf. Ferricyankali- und Kaliumdichromatlösungen fällen goldgelbe bzw. orangegelbe, schwer lösliche Salze des Strychnins aus.

2. Reaktion mit Kaliumdichromat: Dampft man auf einem Uhrgläschen etwas von der Ausschüttelung ein, fügt  $1\text{--}2$  Tropfen konz. Schwefelsäure und 1 Kryställchen Kaliumdichromat zu, das man über den Rückstand im Uhrgläschen unter Druck mit einem Glasstab schiebt, so bilden sich bei Gegenwart von Strychnin blau bis blauviolett gefärbte Streifen. Schärfe der Reaktion  $0,001$  mg. — Die gleiche Färbung kann auch durch andere

Oxydationsmittel z. B. Cerdioxyd, Ceroxyduloxyd nach SONNENSCHNEIN, Vanadinschwefelsäure, MANDELINs Reagens oder Kaliumpermanganat, Bleisuperoxyd usw. hervorgerufen werden.

Die Dichromat- und Ferricyanidsalze geben die Färbung mit konz. Schwefelsäure sehr schön. Die Reaktion als solche ist nicht eindeutig, z. B. geben Curarin, Gelsemin und Yohimbin die gleiche Reaktion.

3. Chlorwasser ruft in Strychninsalzlösungen eine weiße Fällung hervor. Brucin enthaltendes Strychnin oder Brucin bewirken eine Rotfärbung.

4. Kocht man etwa 5—10 mg Strychnin mit 4 ccm Salzsäure (1,18) und 2—3 Stückchen granuliertem Zink auf, gießt nach wenigen Minuten die Flüssigkeit ab und setzt zu der Lösung 1—2 Tropfen einer 0,1%igen Natriumnitritlösung, so tritt bei Gegenwart von Strychnin eine intensive Rotfärbung ein. Empfindlichkeit 0,003 mg.

5. Reaktion nach WHARTON<sup>1</sup>. Eine geringe Menge Strychnin wird in einem Reagensglas in Chloroform gelöst und das Chloroform vorsichtig im heißen Wasserbade abgedampft. Den Rückstand löst man in einer Mischung aus gleichen Teilen konz. Schwefelsäure und Wasser durch Umschütteln auf. Nun läßt man vorsichtig Bromdampf unter häufigerem Umschütteln der Lösung zutreten. Nach wenigem Umrühren tritt eine carminrote Farbe auf, die stärker wird, je mehr von dem aufgenommenen Brom verdampft, was auf dem Wasserbade durch Erwärmen beschleunigt werden kann.

Häufig findet man, daß die chemischen Reaktionen auf Strychnin nicht typisch verlaufen, z. B. kann die Gelbfärbung von Salpetersäure durch Strychnin bisweilen auch wohl mehr oder minder blutrot sein, was den Schluß zuläßt, daß diese nicht typische Reaktion von Brucin, dem ebenfalls in der Brechnuß vorhandenen Alkaloid, herrührt. Will man nun das Strychnin von dem Brucin befreien, um typische Reaktionen zu erhalten, so löst man die isolierten Alkaloide in 2 ccm verd. Schwefelsäure und fügt 2 Tropfen konz. Salpetersäure zu. Nachdem das Gemisch 4 Stunden gestanden hat, setzt man Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion zu und schüttelt die alkalische Lösung mit Äther aus. Nach dem Eindunsten ist der Rückstand frei oder fast frei von Brucin und gibt jetzt einwandfreie Reaktionen auf Strychnin.

Man kann auch die essigsäure Lösung der Alkaloide mit Kaliumdichromat versetzen. Es fällt schwer lösliches Strychninchromat aus, während leichter lösliches Brucinchromat in Lösung bleibt. Das Strychninchromat gibt nun eine einwandfreie Strychninreaktion.

Physiologischer Nachweis. Eine geringe Menge des fraglichen Verdunstungsrückstandes wird in verd. Salzsäure gelöst und zur Trockene verdampft. Den Rückstand nimmt man in etwa  $\frac{1}{4}$  ccm physiologischer Natriumchloridlösung auf und spritzt ihn einer Maus unter die Haut oder einem Frosch in den Lymphsack. Je nach der Menge Strychnin treten die ersten Starrkrampferscheinungen schon nach einigen Minuten oder nach Verlauf einer halben Stunde auf. Die Tiere zeigen tetanische Krämpfe, die durch Anklopfen an das Gefäß, in welchem sie sich befinden, plötzlich wieder ausgelöst werden.

Curarin findet sich beim Nachweis von Strychnin nicht in der natronalkalischen Ausschüttelung nach STAS-OTTO und es ist deshalb schon keine Verwechslung mit diesem, auch im Handel kaum vorkommenden Alkaloid gegeben.

Die Literatur berichtet von in Leichen gefundenen Leichenstrychninen. AMTHOR und MECKE beschreiben diese isolierten Ptomaine. Diese unterscheiden sich wesentlich dadurch von dem Strychnin, daß sie nur schwach bitteren Geschmack aufweisen und keine tetanische Krämpfe auslösen. Die Reaktionen sind denen des Strychnins, wenigstens teilweise, ähnlich.

## 21. Brucin, $C_{20}H_{20}(OCH_3)_2ON_2CO$ .

Wie schon erwähnt, findet sich Brucin ebenfalls in den Strychnos-Samen. Es bildet monokline Prismen oder glänzende Blättchen, die aus Alkohol mit 2 Mol Krystallwasser krystallisieren. Diese Base reagiert stark alkalisch und schmeckt stark bitter. Brucin löst sich in Wasser und Alkohol leichter als Strychnin; leicht löslich ist es in Chloroform und Amylalkohol. Aus diesen Lösungen bleibt es nach dem Eindunsten meist amorph zurück. Brucin läßt

<sup>1</sup> WHARTON: Journ. Pharm. 1901, 8, 201.

sich aus natronalkalischer Lösung im Gange nach STAS-OTTO ausschütteln. — Schmelzpunkt der wasserfreien Base 178°.

Reaktionen. 1. In konz. Schwefelsäure löst sich Brucin farblos, setzt man eine Spur Salpetersäure zu, so tritt eine rosarote- bis blutrote Färbung auf, die allmählich in Gelb übergeht; Strychnin bleibt farblos.

2. Konz. Salpetersäure färbt Brucin blutrot, die Farbe geht alsdann in Gelb über (Strychnin nur gelb). Verdünnt man die gelb gewordene Lösung mit wenig Wasser und setzt etwas farbloses Schwefelammon oder Zinnchlorürlösung zu, so geht die Färbung in Violett über. (Strychnin bleibt unverändert.) FRÖHDES Reagens verhält sich wie konz. Salpetersäure.

3. Einwirkung von Chlorwasser auf Brucin, s. bei Reaktionen auf Strychnin (S. 1362).

Die Trennung des Brucins vom Strychnin s. S. 1362.

## 22. Curarin.

In der Rinde verschiedener Strychnos-Arten befindet sich ein Alkaloid, das Curarin, neben Curin. Das Curin ist kaum giftig, während dem Curarin eine dem Strychnin ähnliche Wirkung zukommt. Da es sich um eine quaternäre Base handelt, so zieht man die Leichenteile mit weinsauerm Alkohol aus, verdunstet diesen und extrahiert den mit Seesand vermischten Rückstand mit Alkohol im SOXHLET-Apparat.

Reaktionen: 1. Konz. Schwefelsäure. Wird der Rückstand auf einem Uhrgläschen mit 1—2 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt und zieht man mit dem Glasstab ein Kaliumdichromatkryställchen hindurch, so entstehen blauviolette Streifen. Konz. Schwefelsäure allein bewirkt schon eine Violettfärbung.

2. MANDELINS Reagens ruft eine violette Färbung hervor, die langsam in Violettbraun übergeht. Strychnin gibt eine beständige Johannisbeerrotfärbung.

3. FRÖHDES Reagens bewirkt eine dunkelgrüne, dann bläuliche Färbung. Strychnin bleibt farblos.

## 23. Chinin, $C_{19}H_{20}N_2 \begin{matrix} \text{OCH}_3 \\ \text{OH} \end{matrix}$ .

In der Rinde verschiedener Cinchona-Arten findet sich neben anderen Alkaloiden das Chinin. Aus alkalischer Lösung läßt sich die Base mit Äther, Chloroform oder Benzol ausschütteln. Das Chinin ist schwer löslich in Wasser, leichter in Alkohol, reagiert stark alkalisch und schmeckt sehr bitter. Die alkoholische Lösung zeigt nach Zusatz von vielen Säuren eine stark blaue Fluoreszenz, bei der schwefelsauren Lösung ist diese noch in einer Verdünnung 1 : 100000 deutlich wahrnehmbar. — Schmelzpunkt 57°; der erneute Schmelzpunkt des geschmolzenen und wieder erstarrten Chinins liegt bei 174,6° und  $[\alpha]_D^{15} - 158,2^\circ$  in 99%igem Alkohol.

Nachweis. Nach dem STAS-OTTOSCHEN Verfahren läßt sich Chinin in alkalischer Lösung ausschütteln. Das Chinin scheidet sich im Harn zum größten Teil unverändert wieder aus.

Reaktionen. 1. Fluoreszenzprobe: Chinin gibt auf Zusatz von verd. Schwefelsäure stark blaue Fluoreszenz.

2. Thalleiochinprobe. Wird wenig Chinin in etwas verd. Essigsäure gelöst und werden hierzu einige Tropfen starkes Chlorwasser zugesetzt, so entsteht eine farblose, schwach bläulich fluoreszierende Lösung. Auf Zugabe von überschüssigem Ammoniak tritt eine schön grüne Färbung auf. Wenn mehr Chinin verwendet wird, so bildet sich ein grüner Niederschlag.

3. Erythrochininreaktion. Wird die Lösung einer kleinen Menge Chininbase in verd. Essigsäure mit je einem Tropfen halbgesättigten Bromwassers und einer Ferricyanalkaliumlösung (1:10) und der gleichen Menge 10%igen Ammoniaks versetzt, so färbt sich das Gemisch nach dem Umschütteln allmählich rot. Schüttelt man die rote Flüssigkeit sofort mit Chloroform aus, so nimmt dieses eine violettrote Färbung an. Schärfe der Reaktion 1:100000.

4. Herapathitreaktion. Löst man etwa 0,01 g Chinin in 20 Tropfen einer Mischung, bestehend aus 30 Tropfen Essigsäure, 20 Tropfen absol. Alkohol und 1 Tropfen 20%iger Schwefelsäure, erhitzt zum Sieden und fügt 1 Tropfen einer alkalischen Jodlösung (1:10)

zu, so scheiden sich, zuweilen erst nach einiger Zeit, metallisch grün schimmernde glänzende Krystallblättchen aus, Herapatit genannt. Im reflektierten Licht erscheinen die Kryställchen schön cantharidgrün.

#### 24. Yohimbin, $C_{21}H_{26}N_2O_3$ (Anhydrid).

Das Yohimbin kommt in der Rinde des Yohimbebaumes, einer westafrikanischen Rubiacee, vor. Yohimbin ist eine rechtsdrehende tertiäre Base, die durch Einwirkung von Kalilauge unter Abspaltung von Methylalkohol in Yohimboasäure übergeht. Das salzsaure Salz findet arzneiliche Anwendung. Die Base bildet weißliche Krystalle, die allmählich gelblich werden; sie ist in Wasser fast unlöslich, schwer löslich in Benzol und Petroläther, leicht dagegen in Alkohol, Äther und Chloroform. Das salzsaure Salz ist in Wasser ziemlich schwer löslich, leicht löslich dagegen in Alkohol. Nach STAS-OTTO kann in der natronalkalischen Lösung durch Äther oder Chloroform das Yohimbin ausgeschüttelt werden. — Schmelzpunkt der Base 234—235°, des salzsauren Salzes gegen 300°.

Reaktionen. 1. Alkaloidfällungsmittel. Mit diesen gibt das Yohimbin starke Fällungen.

2. Farbreaktionen. Das Yohimbin gibt mit FRÖHDES, MANDELINS und MECKES Reagens sofort eine intensive Blauviolett färbung, die später in Grün übergeht. Konz. Schwefelsäure färbt Yohimbin nicht, setzt man ein Kryställchen Kaliumdichromat zu, so entstehen violettrote Streifen, die bald in Grün übergehen.

3. MELZERS Probe. Setzt man zu Yohimbin 1 Tropfen MELZERS Reagens (1 g Benzaldehyd in 4 g absol. Alkohol gelöst) und alsdann 2 Tropfen konz. Schwefelsäure, so tritt eine dunkelbraune Färbung auf, die allmählich in Kirschrot und endlich in Violett übergeht.

### Übersicht der wichtigsten Alkaloidreaktionen.

#### I. Farbreaktionen<sup>1</sup>.

(E = beim Erwärmen; R = vom Rande her.)

| Alkaloid                  | Konz. Schwefelsäure                                 | ERDMANN'S Reagens   | FRÖHDES Reagens   |
|---------------------------|---|---|---|
| Aconitin . . . . .        | gelb  | gelb  | gelb  |
| Apomorphin . . . . .      | farblos   | farblos   | schmutzig grün,<br>allmählich blau <sup>2</sup>   |
| Berberin . . . . .        | olivgrün, bald gelb                                 | olivgrün, gelbbraun                                       | braungrün   |
| Brucin . . . . .          | farblos   | blutrot, allmählich gelb                                  | rot, allmählich gelb  |
| Cytisin . . . . .         | farblos   | orange gelb, gelbbraun                                    | farblos   |
| Emetin . . . . .          | farblos <sup>3</sup> oder<br>braungrün <sup>4</sup> | grün <sup>4</sup>   | braun <sup>3</sup> , rot <sup>4</sup> , bald<br>blaugrün  |
| Eukodal . . . . .         | farblos, beim<br>Erwärmen gelblich                  | farblos   | gelb, grün; (R)<br>schwach bläulich (nach<br>5—10 Minuten), dann<br>in der Mitte schmutzig<br>violett |
| Euporphin . . . . .       | farblos; (E) braungrün                              | fast farblos; (E)<br>schmutzig violett,<br>dann braungrün | sofort dunkelgrün   |
| Hydrastin . . . . .       | farblos; (E) violett                                | gelb  | grün, später braun  |
| Hydrastinin . . . . .     | gelblich, blau fluores-<br>zierend; (E) bräunlich   | gelb; (E) bräunlich                                       | gelb; (E) dunkelbraun   |
| Codein (Dionin) . . . . . | farblos; (E) rötlich,<br>bläulich                   | farblos; (E) blau   | gelbgrün, später blau   |

<sup>1</sup> Nach GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie.

<sup>2</sup> Verändertes Apomorphin wird durch FRÖHDE sofort blau.

<sup>3</sup> Reines Emetin. <sup>4</sup> Basen der Wurzel.

| Alkaloid               | Konz. Schwefelsäure   | ERDMANN'S Reagens   | FRÖHDE'S Reagens   |
|------------------------|---|---|--|
| Colchicin . . . . .    | gelb  | violett, schnell gelb                                     | violett, schnell gelb  |
| Cotarnin. . . . .      | gelblich; (E) rötlich,<br>schnell mißfarben   | gelb; (E) schmutzig<br>rot                                | gelbgrün; (E)<br>schmutzig himbeerrot,<br>zuerst dunkler grün                      |
| Lobelin . . . . .      | gelblich, rötlich   | gelblich, rötlich   | braun, intensiv grün <sup>1</sup>  |
| Morphin (Heroin).      | farblos, höchstens<br>schwach rötlich   | farblos, höchstens<br>schwach rötlichgelb;<br>(E) dunkler | violett, allmählich<br>blau, schmutzig grün,<br>gelb blaßrosa                      |
| Morphosan. . . . .     | farblos; (E) schmutzig<br>braungrün   | farblos; (E) wie vor                                      | sofort schön violett,<br>dann schmutzig grün-<br>lich braun                        |
| Narcotin . . . . .     | grüngelb, gelbrot;<br>(E) Orange; (R) blau-<br>violett purpurn,<br>schmutzig rotviolett | rot, allmählich inten-<br>siver; (E) kirschrot            | blaugrün, grünrötlich,<br>gelb   |
| Narcein . . . . .      | gelb; (E) blutrot   | braun; (R) violett,<br>schmutzig rot                      | dunkeloliv, schnell<br>grün; (E) rötlichbraun,<br>blutrot; (R) korn-<br>blumenblau |
| Oxydimorphin . . . . . | farblos   | braunrot, bald braun                                      | zuerst blau, dann<br>violett, dann wie<br>Morphin                                  |
| Papaverin . . . . .    | farblos; (R) lang,<br>(E) schwach blauviolett   | dunkelrot   | grün; (E) blau <sup>2</sup>  |
| Peronin . . . . .      | rötlichgelb;<br>(E) braunrot  | rötlichgelb; (E) rot                                      | rotviolett, schnell<br>braungrün   |
| Physostigmin . . . . . | farblos; (E) farblos<br>bleibend  | schwach rötlichgelb;<br>(E) etwas stärker                 | wie ERDMANN  |
| Solanin . . . . .      | orange; (E) braunrot,<br>vorher schmutzig<br>violett                                    | orange; (E) ähnlich<br>wie vor                            | orange; (E) ähnlich<br>wie vor   |
| Thebain . . . . .      | blutrot, allmählich<br>gelbrot  | blutrot, allmählich<br>gelbrot                            | wie vor  |
| Veratrin . . . . .     | gelb, orange, grün,<br>rot, carminrot   | wie vor, aber<br>schnellerer Farben-<br>wechsel           | wie vor  |
| Yohimbin . . . . .     | farblos; (E) farblos<br>bleibend  | allmählich rötlich;<br>(E) schmutzig rot                  | intensiv blau; (R) grün  |

## II. Reaktionen mit Arsen-Schwefelsäure nach ROSENTHALER und F. TÜRK <sup>3</sup>.

Man löst ein Körnchen der zu prüfenden Substanz im Reagensgläschen in 2—3 cem einer 1%igen Lösung von Arsensäure in konz. Schwefelsäure und beobachtet die Reaktion in der Kälte, nach Zusatz von Salzsäure oder nach dem Erwärmen im siedenden Wasserbad.

| Alkaloid             | Kalt                          | Nach Zusatz<br>von Salzsäure | Warm                               | Nach Zusatz<br>von Salzsäure |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| Apomorphin . . . . . | gelbgrün                      | rosaviolett                  | grün                               | braun                        |
| Berberin . . . . .   | gelb, dann<br>dunkel gelbgrün | zwiebel- bis<br>kirschrot    | dunkel, keine<br>bestimmte Färbung | zwiebel- bis<br>kirschrot    |
| Brucin . . . . .     | schwach violett               | —                            | schwach violett                    | —                            |

<sup>1</sup> Unrein mit FRÖHDE, nach kurzer Zeit Violettfärbung, nach 1—2 Stunden braun, gelb.

<sup>2</sup> Unrein mit konz. Schwefelsäure gleich blauviolett.

<sup>3</sup> ROSENTHALER u. F. TÜRK: Apoth.-Ztg. 1904, 19, 186.

| Alkaloid           | Kalt                              | Nach Zusatz von Salzsäure | Warm   | Nach Zusatz von Salzsäure       |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|
| Chinin . . . . .   | —                                 | gelbgrüne Fluoreszenz     | —  | —                               |
| Codein . . . . .   | blauviolett                       | —                         | dunkelblauviolett  | purpurrot                       |
| Dionin . . . . .   | gelb                              | braun                     | blau, dann grün  | purpurrot mit Stich ins violett |
| Heroin . . . . .   | gelbbraun mit rötlichem Stich     | —                         | schwarzgrün  | kirschrot                       |
| Hydrastin . . . .  | gelb                              | —                         | kirschrot  | —                               |
| Hydrastinin . . .  | Fluoreszenz                       | —                         | kirschrot  | —                               |
| Morphin . . . . .  | grünlichblau, dann grün           | rotviolett                | blau, rasch in smaragdgrün, später dunkelgrün übergehend | rotviolett                      |
| Narcein . . . . .  | safrangelb, später dunkel gelbrot | rötlich                   | braunrot   | blutrot                         |
| Narkotin . . . . . | grünlichgelb                      | —                         | kirschrot  | gelbrot                         |
| Papaverin . . . .  | hellviolett                       | —                         | hellviolett  | —                               |
| Thebain . . . . .  | gelblichrot                       | —                         | gelblichrot  | gelb                            |
| Veratrin . . . . . | Fluoreszenz                       | —                         | —  | —                               |

### C. Stark wirkende Arzneimittel und technische Chemikalien.

Stark wirkende Arzneimittel und gebräuchlichere technische organische Chemikalien finden sich nach dem Verfahren von STAS-OTTO meist in der sauren Ausschüttelung; wenn es solche sind, die basischen Charakter besitzen, so findet man sie in der natronalkalischen oder ammoniakalischen Ausschüttelung. Quaternäre Basen können aus der Lösung nach vorheriger Eintrocknung mit Seesand durch Extraktion mit Alkohol isoliert werden. Näheres über die Auffindung und den Nachweis von Arzneimitteln s. auch ROJAHN<sup>1</sup>, GADAMER<sup>2</sup> und L. EKKERT<sup>3</sup>. Es seien hier nur die wichtigsten dieser Stoffe in den Kreis des Nachweises mit einbezogen, da sich die Zahl dieser Stoffe tagtäglich vermehrt und es der Findigkeit des Chemikers überlassen sein muß, die nach den beschriebenen Methoden isolierten und gereinigten Gifte und stark wirkenden Arzneimittel zu identifizieren.

#### a) Phenole.

**1. Resorcin (m-Dioxybenzol), C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>.** Das Resorcin bildet weiße, rombische Kryställchen, die einen süßlichen Geschmack besitzen und in Wasser, Alkohol, Äther leicht, in Chloroform schwer löslich sind. — Schmelzpunkt 111°; Siedepunkt 276°.

Nachweis. Resorcin läßt sich aus der sauren Lösung nach STAS-OTTO ausschütteln.

Reaktionen. 1. Eisenchloridlösung bewirkt Violettfärbung.

2. Bromwasser erzeugt einen gelblichweißen Niederschlag von Tribromresorcin.

3. Ammoniakalische Silberlösung wird reduziert.

<sup>1</sup> ROJAHN: Pharm. Zentralh. 1929, 70, 325.

<sup>2</sup> GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie.

<sup>3</sup> L. EKKERT: Erkennung organischer Verbindungen im besonderen von Arzneimitteln. Stuttgart: Ferdinand Enke.

5. Resazurinprobe nach WESELSKY. Versetzt man eine Spur Resorcin mit etwas Äther und fügt einige Tropfen rauchende Salpetersäure hinzu, so scheidet sich nach 24stündigem Stehen Resazurin ab, das in Ammoniak gelöst, dieses blauviolett färbt.

2. Pikrinsäure (Trinitrophenol),  $C_6H_2(NO_2)_3(OH)$ . Es stellt stark gelb gefärbte Blättchen vor, die in Wasser schwer, leicht dagegen in Alkohol, Äther und Benzol löslich sind. Die Lösung hat einen stark bitteren Geschmack. — Schmelzpunkt  $122,5^{\circ}$ .

Nachweis. Nach dem Gang von STAS-OTTO läßt sich Pikrinsäure durch Äther aus der sauren Lösung ausschütteln. Bei Anwesenheit von Pikrinsäure fällt die Lösung schon durch die gelbe Färbung auf. Durch Vergiftung mit Pikrinsäure erleidet das Blut eine Zersetzung unter Bildung von Methämoglobin. Nachweis s. S. 1431.

Reaktionen. 1. Wollprobe: Wolle und auch Seide werden durch wäßrige Pikrinsäurelösung gelb gefärbt. Schärfe 1:100000.

2. Isopurpursäure-Reaktion. Wird eine wäßrige Pikrinsäurelösung auf etwa  $60^{\circ}$  erwärmt und fügt man ihr einige Tropfen einer gesättigten wäßrigen Cyankaliumlösung zu, so entsteht eine tiefrote Färbung, isopurpursäures Kalium. Schärfe 1:50000.

3. Pikraminsäure-Reaktion. Wird eine Pikrinsäurelösung mit je 1—2 Tropfen Natronlauge und Glucoselösung versetzt, so tritt eine Dunkelrotfärbung ein; die Natronlauge darf nicht im Überschuß vorhanden sein.

4. Fluoresceinprobe. Wird etwas Resorcin mit Phthalsäureanhydrid einige Minuten bis nahe zum Sieden erhitzt und in Natronlauge gelöst, so entsteht eine grüne, stark fluoreszierende Lösung.

Der Harn wird durch gebildete Pikraminsäure hochrot gefärbt.

Martiusgelb (Dinitro- $\alpha$ -Naphthol),  $C_{10}H_5(NO_2)_2OH$ , kommt als Kalium- und Natriumsalz im Handel vor und besitzt intensiv gelbe Färbung. — Schmelzpunkt  $138^{\circ}$ .

## b) Säuren.

1. Oxalsäure,  $HOOC-COOH$ , und ihr saures Kaliumsalz, das Kleesalz,  $HOOC-COOK$ , haben schon häufiger Vergiftungen hervorgerufen. Beide sind in Wasser leicht löslich; das saure Kaliumsalz ist jedoch weniger leicht löslich. Die Oxalsäure ist ein normales Stoffwechselprodukt. Der Organismus scheidet innerhalb 24 Stunden 0,1 g Oxalsäure aus (Bd. I, S. 1062).

Nachweis: Um aus Leichenteilen, Mageninhalt oder Erbrochenem die Oxalsäure zu isolieren, verfährt man in folgender Weise: Das Untersuchungsmaterial wird mit etwa der vierfachen Menge Alkohol und mit verd. Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt. Unter häufigerem Umrühren läßt man die Mischung mehrere Stunden kalt stehen und kocht durch ein Tuch. Der dann noch filtrierte Flüssigkeit werden etwa 25 ccm Wasser zugesetzt und der Alkohol auf dem Wasserbade verdampft. Der Wasserzusatz ist notwendig, damit die Oxalsäure nicht durch den Alkohol verestert wird und sich verflüchtigt. Der wäßrige Rückstand wird filtriert, das Filtrat mehrmals mit reichlichen Mengen Äther ausgeschüttelt, der Äther abdestilliert und der Rückstand mit einigen Kubikzentimetern Wasser aufgenommen. Die klare Lösung wird mit Ammoniak neutralisiert und mit etwa 15 ccm gesättigter Gipslösung versetzt. Die Ausscheidung eines weißen Niederschlages zeigt Oxalsäure an. Die Krystalle haben meist, unter dem Mikroskop betrachtet, Oktaederform, Briefkuvertform. Man kann auch die Fällung zugleich quantitativ durchführen und das nach dem Glühen im Gebläse vorhandene Calciumoxyd zur Wägung bringen. 1 Mol  $CaO = 1$  Mol Oxalsäure.  $CaO \times 2,25 =$  Oxalsäure mit 2 Mol Krystallwasser.

Beim Glühen darf keine Schwärzung auftreten, sonst können andere organische Säuren, Weinsäure, Citronensäure usw. vorliegen.

2. Salicylsäure s. S. 1318. Die Salicylsäure ist in der sauren Lösung nach STAS-OTTO auffindbar und kann durch Äther der Lösung entzogen werden.



## c) Schlafmittel.

## 1. Sulfonal, Trional, Tetronal.

Diese drei Schlafmittel haben häufiger zur Vergiftung geführt. Sie werden teils unverändert und teils als Alkylsulfonsäure im Harn ausgeschieden. Ferner tritt eine Zersetzung des Blutes bei Sulfonalvergiftung ein. Im Harn kann man vielfach Hämatoporphyrin nachweisen.

Sulfonal, Dimethylmethandiäthylsulfon =  $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{matrix} < \begin{matrix} \text{SO}_2 - \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{SO}_2 - \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$ . Schmelzpunkt 125,5°,

Trional, Methyläthylmethandiäthylsulfon =  $\begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{matrix} < \begin{matrix} \text{SO}_2 - \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{SO}_2 - \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$ . Schmelzpunkt 76°.

Tetronal, Diäthylmethandiäthylsulfon =  $\begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix} < \begin{matrix} \text{SO}_2 - \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{SO}_2 - \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$ . Schmelzpunkt 86—89°.

Nachweis. Die drei Schlafmittel sind in kaltem Wasser schwer löslich und bilden farblose, weiße Krystalle. Auch in faulenden Leichenteilen sind sie noch lange haltbar. Der saure alkoholische Auszug nach STAS-OTTO muß nach Entfernung des Alkohols mit viel heißem Wasser mehrmals aufgenommen werden. Aus den wäßrigen Lösungen werden alsdann die Schlafmittel durch Äther ausgeschüttelt. Durch Umkrystallisieren können sie gereinigt werden.

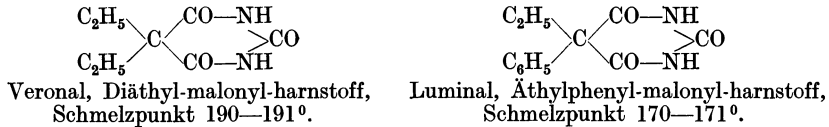
Reaktionen. Werden die isolierten Krystalle mit Reduktionsmitteln (Holzkohlepulver, Pyrogallol usw.) erhitzt, so bildet sich Mercaptan, das an seinem typischen Geruch erkennbar ist. Schmilzt man einige Krystalle mit der doppelten Menge Cyankalium im Reagensglas zusammen, so tritt Mercaptangeruch auf und es bildet sich gleichzeitig Rhodankalium, das im Filtrat, das schwach angesäuert wurde, mit Eisenchlorid nachgewiesen werden kann.

Isolierung der Schlafmittel aus dem Harn. Der Harn wird bis auf etwa  $\frac{1}{10}$  seines Volumens eingedampft und der Rückstand mit Äther extrahiert. Nach Klärung des Äthers wird abdestilliert und der Rückstand mit etwa 10% iger Natronlauge auf dem Wasserbade eingedampft. Auf diese Weise werden die färbenden Substanzen zerstört. Der Rückstand wird erneut mit Äther ausgezogen und der nach dem Verdunsten des Äthers zurückbleibende Rückstand näher identifiziert.

Hämatoporphyrin-Nachweis im Harn. Im Harn kann man ferner noch bei Sulfonalvergiftung das Hämatoporphyrin nachweisen. Ist der Harn rot, braunrot oder auch kirschrot gefärbt, so wird er tropfenweise mit Natronlauge bis zur stärker alkalischen Reaktion versetzt. Um den Blutfarbstoff niederzuschlagen, setzt man Bariumchloridlösung zu. Nach dem Absetzen des Niederschlages wird er gesammelt und gut ausgewaschen. Alsdann setzt man heißen Alkohol zu, dem etwas verd. Schwefelsäure zugegeben ist. Einige Tropfen genügen. Der Alkohol enthält nun den Blutfarbstoff, der spektroskopisch (S. 1431) untersucht werden kann. Die sauren Hämatoporphyrinlösungen sind im konzentrierten Zustande kirschrot und im verdünnten violett gefärbt. Das Spektrum zeigt die zwei charakteristischen Absorptionsstreifen. Setzt man jetzt Ammoniak oder Alkalilauge zu, so treten die vier charakteristischen Absorptionsstreifen des Hämatoporphyrin in alkalischer Lösung auf. Bei Trional ist eine Hämatoporphyrinausscheidung nicht beobachtet worden.

2. Veronal, Luminal, Phanodorm, Noctal, Curral, Allional, Santoptal und Veramon: Diese Schlafmittel sind Abkömmlinge der Barbitursäure, Malonylharnstoff, in dem die H-Atome des Malonsäurerestes durch Alkyl- oder andere Gruppen ersetzt sind. Auch kommen diese Abkömmlinge in Molekularverbindung mit anderen Stoffen z. B. Pyramidon usw. in den Handel.

Man kann in Leichenteilen und im Harn vielfach die Komponenten, z. B. Pyramidon und den Barbitursäure-Abkömmling, als solche nachweisen. Der Nachweis aller dieser Schlafmittel kann, wie bei Veronal beschrieben, erfolgen. Am gebräuchlichsten dürfte wohl das Veronal sein, während Luminal weniger häufig benützt wird.



Die beiden Schlafmittel bilden weiße, schwach bitter schmeckende Krystallblättchen von schwach saurer Reaktion. In Wasser sind Veronal und Luminal schwer löslich, leicht löslich in verd. Natronlauge, Äther und Alkohol.

Nachweis. Aus Leichenteilen, Erbrochenem usw. lassen sich nach STAS-OTTO Veronal und Luminal, sowie verschiedene andere Abkömmlinge der Barbitursäure aus der saueren Lösung mit Äther ausschütteln. Durch den Harn werden Veronal und Luminal als solche unverändert ausgeschieden.

Die Isolierung aus dem Harn wird in der Weise durchgeführt, daß man ihn auf dem Wasserbade auf ein kleines Volum eindampft und etwa 3—4mal mit viel Äther ausschüttelt, oder im Extraktionsapparat auszieht. Nach Abdestillieren des Äthers wird der dunkel gefärbte Rückstand in nicht zuviel heißem Wasser gelöst, mit Tierkohle längere Zeit (15—20 Minuten) gekocht und heiß filtriert. Die wäßrige Lösung wird alsdann in Eiswasser gestellt. Scheiden sich keine Krystalle ab, so wird die Lösung eingengt und in gleicher Weise nochmals abgekühlt. Die abgeschiedenen Krystalle können nötigenfalls durch Sublimation weiter gereinigt werden. Auch kann man den Verdampfungsrückstand in pyridinhaltigem Wasser lösen und der Lösung je nach der Menge des Rückstandes eine Mischung aus 4 ccm einer 10%igen wäßrigen Kupfersulfatlösung + 1 ccm Pyridin und 5 ccm Wasser zusetzen. Es entstehen schwer lösliche Doppelverbindungen, die aus Veronal bzw. einem andern Barbitursäurederivat bestehen. Den gesammelten Niederschlag kann man durch verd. Säure zerlegen und erhält dann reine Produkte<sup>1</sup>.

Gut bewährt hat sich auch die Methode nach MOLLE: Man setzt neutrale Bleiacetatlösung solange dem Harn zu, als noch ein Niederschlag erfolgt. Das Filtrat wird durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, durch Kochen mit Tierkohle entfärbt, eingedampft und mit Natriumchlorid bis zur Sättigung versetzt. Diese Lösung wird alsdann mit Äther ausgeschüttelt. Die isolierten Krystalle können durch Bestimmung des Schmelzpunktes näher charakterisiert werden. Liegt der Schmelzpunkt bei dem des Veronals oder Luminals, so kann man mit Veronal oder Luminal den Mischschmelzpunkt feststellen. Wenn dadurch der Schmelzpunkt nicht wesentlich verändert wird, dann liegt Veronal bzw. Luminal vor.

Als weiterer Nachweis kann die für alle Barbitursäureabkömmlinge charakteristische Blaufärbung ihrer Barium-Kobalt-Verbindungen dienen. Fügt man zu der in Methylalkohol gelösten Substanz etwas Kobaltchloridlösung und 0,25 g Bariummethylat, so entsteht eine intensiv blaue Färbung. Weiter kann man noch den Stickstoff durch die Berlinerblaureaktion qualitativ nachweisen, indem man einige Kryställchen mit metallischem Natrium im Reagensglas schmilzt und in Cyannatrium überführt (s. S. 1288). Durch eine quantitativ durchgeführte Mikro-KJELDAHL-Stickstoffbestimmung kann nachgewiesen werden, ob Veronal oder Luminal vorliegt, während man durch Wägung des isolierten und gereinigten Rückstandes die Menge als solche bestimmen kann.

<sup>1</sup> Pharm. Weekbl. 1931, 68, 975.

Außer Veronal und Luminal werden noch andere Abkömmlinge der Barbitursäure als Schlafmittel verwendet, nämlich Medinal das Natriumsalz des Veronals, welches man jedoch aus den Leichteilen nur in Gestalt von Veronal isolieren kann, Phanodorm, Noctal, Curral, Allional, Sandoptal, Veramon.

Zum Teil werden diese Stoffe im Organismus verändert und ihre Zersetzungsprodukte durch den Harn ausgeschieden<sup>1</sup>, wie oben erwähnt.

**3. Adalin und Bromural.** Adalin (Diäthyl-bromacetylarnstoff)  $(C_2H_5)_2CBr-CO-NH-CONH_2$ , und Bromural, ( $\alpha$ -Monobrom-isobaldriansäurearnstoff),  $(CH_3)_2-CH-CHBr-CO-NH-CO-NH_2$ , sind in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich, leicht löslich in Alkohol und Benzol, Bromural jedoch auch in Äther. — Schmelzpunkte: Adalin 117—118°, Bromural 145°.

Bei längerem Erhitzen mit Wasser entsteht aus Adalin  $\alpha$ -Diäthyl-hydantoin (Schmelzpunkt 182—183°) und aus Bromural Isopropylhydantoin (Schmelzpunkt 216—217°).

Nachweis. Kocht man Adalin mit alkoholischer Kalilauge, so entsteht Bromkalium und Cyankalium unter Entwicklung von Ammoniak. Man kann also hier den Nachweis von Cyan, Brom und Ammoniak antreten.

Wird Bromural mit alkoholischer Kalilauge gekocht, so bildet sich Bromkalium und Cyankalium und zugleich Isopropylhydantoin. Kocht man Bromural mit 50%iger Schwefelsäure, so tritt ein Geruch nach Baldriansäure auf.

#### d) Fiebermittel.

**1. Antifebrin** (Acetanilid),  $C_6H_5NH(OC \cdot CH_3)$  bildet farblose, glänzende Blättchen von schwach brennendem Geschmack, die in Wasser schwerer, leicht dagegen in Alkohol, Äther und Chloroform sich lösen und von neutraler Reaktion sind. — Schmelzpunkt 113—114°, Siedepunkt 295°.

Nachweis. Acetanilid kann nach STAS-OTTO aus der weinsäuren Lösung durch Äther ausgeschüttelt werden. Eingenommen, findet es sich im Harn an Schwefelsäure gebunden als Acetyl-p-Amino-Phenolschwefelsäure vor, z. T. ist es auch an Glucuronsäure gebunden. Beim Kochen des Harnes mit konz. Salzsäure und darauffolgender Übersättigung mit Natriumcarbonat kann man das p-Aminophenol mit Äther ausschütteln. Der Verdunstungsrückstand gibt wie Acetanilid selbst die Indophenolprobe.

Reaktionen. 1. Indophenolreaktion: Wird Acetanilid mit etwa 4 ccm rauchender Salzsäure gekocht, die Lösung auf etwa 10 Tropfen eingedampft und der Rückstand nach dem Erkalten mit einigen Kubikzentimetern Carbolwasser versetzt, so wird durch tropfenweises Zugeben einer Chlorkalklösung eine schmutzig-rotviolette Farbe hervorgerufen, die beim Umschütteln zunimmt. Phenacetin gibt die gleiche Reaktion.

2. Isonitritprobe: Wird zwecks Verseifung etwas Acetanilid mit alkoholischer Kalilauge einige Minuten gekocht und nach dem Abkühlen mit 2 Tropfen Chloroform versetzt, so tritt nach erneutem Aufkochen der widerliche Isonitritgeruch auf. Phenacetin gibt die Reaktion nicht.

**2. Phenacetin** (p-Acetphenetidin),  $C_6H_4 \begin{matrix} \text{NH}(OC \cdot CH_3) \\ \text{OC}_2H_5 \end{matrix}$ , bildet farblose Krystallblättchen, die fast geschmacklos sind. In kaltem Wasser ist die Löslichkeit sehr gering; leicht löslich ist Phenacetin in Alkohol, Äther und Chloroform. Die Lösungen reagieren neutral. — Schmelzpunkt 134—135°.

Nachweis: In dem Gang nach STAS-OTTO kann Phenacetin aus weinsäurer Lösung durch Äther ausgeschüttelt werden. Im Harn wird Phenacetin wie Antifebrin gepaart an Schwefelsäure oder Glucuronsäure ausgeschieden. Durch die Indophenolprobe ist es nachweisbar, s. Antifebrin.

<sup>1</sup> Beiträge zum Nachweis wichtiger Barbitursäurederivate von Dr. KAISER. Stuttgart: Verlag. Südd. Apoth.-Ztg. 1932.

1. Indophenolreaktion. Wie bei Antifebrin.

2. Kocht man Phenacetin mit konz. Salzsäure und fügt, nachdem man einige Minuten gekocht hat, etwa 10 ccm Wasser und einige Tropfen Chromsäurelösung zu, so tritt eine rubinrote Färbung auf. Antifebrin wird gelb.

2. Salpetersäureprobe nach AUTENRIETH<sup>1</sup>. Wird Phenacetin mit einigen Kubikzentimetern einer etwa 10%igen Salpetersäure zum Sieden erhitzt, so tritt eine gelbe bis rote Farbe der Lösung auf. Nach dem Abkühlen scheiden sich gelbe Nadeln von Nitrophenacetin mit dem Schmelzpunkt 103° aus. Antifebrin und Antipyrin geben farblose Lösungen.

3. Antipyrin (Dimethyl-phenyl-pyrazolon),  $C_{11}H_{12}ON_2$ , bildet weiße, monokline Krystallnadeln, die nur schwach bitterlich schmecken und in Wasser, Alkohol und Chloroform leicht, schwerer löslich in Äther sind. — Schmelzpunkt 113°, Pikrat 188°.

Nachweis. Antipyrin läßt sich nach dem Gang von STAS-OTTO aus der weinsauren Ausschüttelung in geringer Menge isolieren, die Hauptmenge aber kann aus der natronalkalischen Lösung mit Äther ausgeschüttelt werden. Antipyrin kann bei Vergiftung in allen Organen nachgewiesen werden. Im Harn findet es sich z. T. unverändert, z. T. an Schwefelsäure gebunden als gepaarte Schwefelsäure. Solcher Harn gibt mit Eisenchlorid eine Rotfärbung und ist vielfach selbst schon etwas rötlich gefärbt. Zur Isolierung des Antipyrins aus dem Harn säuert man ihn mit verd. Schwefelsäure an und fällt das Antipyrin mit Kaliumwismutjodidlösung aus. Den Niederschlag sammelt man auf der Nutsche, wäscht ihn mit angesäuertem Wasser aus und zerlegt ihn mit einer Anreibung von krystallisiertem Natriumcarbonat und 10%iger Natronlauge. Die ganze Mischung bringt man in einen Schüttelzylinder und schüttelt das Antipyrin mit Chloroform aus. Nach Verdunsten des Chloroforms bleibt das Antipyrin zurück.

Reaktionen. 1. Die Alkaloidreagenzien geben mit Antipyrin Niederschläge.

2. Eisenchloridprobe. Eine verd. Antipyrinlösung wird durch 1—2 Tropfen Eisenchloridlösung tiefrot gefärbt; durch Zusatz von Schwefelsäure geht die Färbung in Hellgelb über.

3. Probe mit rauchender Salpetersäure. Auf Zusatz von 1—2 Tropfen rauchender Salpetersäure wird eine Antipyrinlösung grün gefärbt. Wird die Lösung zum Sieden erhitzt und fügt man noch 1—2 Tropfen konz. Salpetersäure zu, so schlägt die Farbe in Rot um.

4. Wird eine geringe Menge Antipyrin in einigen ccm einer Lösung von 1 g p-Dimethyl-amido-benzaldehyd in 5 ccm 25%iger Salzsäure und 95 ccm absol. Alkohol gelöst und auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft, so bleibt ein hellroter Rückstand. (Unterschied von Pyramidon.)

4. Pyramidon (Dimethyl-amido-antipyrin),  $C_{11}H_{11}[N(CH_3)_2]N_2O$ , bildet geruchlose, weiße Krystalle von bitterem Geschmack. In kaltem Wasser und Äther ist Pyramidon schwer löslich, leicht löslich dagegen in Alkohol und Chloroform. Die wäßrige Lösung zeigt schwach alkalische Reaktion. — Schmelzpunkt 108°.

Nachweis. Pyramidon läßt sich im Gang von STAS-OTTO aus natronalkalischer Lösung durch Äther oder Chloroform ausschütteln. Im Harn findet sich unverändertes Pyramidon.

Reaktionen. 1. Eisenchloridprobe: Eine verd. Pyramidonlösung wird nach Zusatz von wenig Salzsäure und Eisenchlorid blaviolett gefärbt.

2. Silbernitratreaktion. Die wäßrige Lösung wird auf Zusatz von Silbernitratlösung violett gefärbt. Später scheidet sich Silber aus.

3. Überschichtet man Harn mit alkoholischer Jodlösung, so bildet sich bei Gegenwart von Pyramidon ein violetter Ring, der nach einiger Zeit rotbraun wird.

5. Salophen (Acetyl-p-amidophenol-salicylsäureester),  $C_6H_4 \begin{matrix} \text{OOC} \cdot C_6H_4 \cdot \text{OH} \\ \text{NH}(\text{OCC}_2\text{H}_5) \end{matrix}$ , ist ein farb- und geruchloses Krystallpulver, das in Wasser sehr schwer, leichter löslich dagegen in Alkohol ist. — Schmelzpunkt 187—188°.

Nachweis. Nach dem Gang von STAS-OTTO wird das Salophen aus saurer Lösung durch Äther ausgeschüttelt.

<sup>1</sup> AUTENRIETH: Arch. Pharm. 1891, 229, 456.

Reaktionen. 1. Indophenolreaktion: Wird Salophen mit Salzsäure gekocht, so gibt es die Indophenolreaktion, jedoch etwas schwächer als Antifebrin (S. 1370).

2. Die alkoholische Lösung gibt mit Eisenchlorid eine Gelbfärbung.

3. Essigätherreaktion. Erhitzt man Salophen mit konz. Schwefelsäure und einigen Tropfen Alkohol einige Minuten lang im siedenden Wasserbade, so tritt ein Geruch nach Essigäther auf.

### e) Organische Basen.

1. Anilin (S. 1318). Wenn Anilin nicht durch Wasserdämpfe aus der alkalischen Lösung übergetrieben worden ist, so findet man es in dem natronalkalischen Auszug nach STAS-OTTO, aus dem es mit Äther ausgeschüttelt werden kann. Nach Verdunsten des Äthers bleibt das Anilin als ölige Tropfen zurück.

2. Paraphenyldiamin,  $C_6H_4(NH_2)_2$ , bildet farblose Krystalle, die an der Luft sich schnell bräunen. Es sublimiert bei  $267^\circ$  unzersetzt. In Wasser ist die Base löslich, leicht löslich in Alkohol, Äther und Benzol. — Schmelzpunkt  $147^\circ$ .

Nachweis. Im Gang nach STAS-OTTO läßt es sich aus der schwach natronalkalischen Lösung durch Äther ausschütteln.

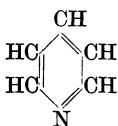
Reaktionen. 1. Setzt man zu der schwach salzsauren Lösung einige Tropfen einer 5%igen Natriumnitritlösung, so tritt eine Gelbfärbung ein; gibt man etwas Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion zu, so geht die Farbe in Dunkelbraunrot über.

3. Mit Anilin und etwas Eisenchloridlösung versetzt, entsteht eine blaue Färbung (Methylenblaubildung).

4. Mit Schwefelwasserstoff und Eisenchloridlösung gelinde erwärmt, tritt eine violette Färbung auf.

5. Holz wird durch p-Phenyldiamin eine rote Färbung erteilt. Nicht typisch.

3. Pyridin ist eine tertiäre Base. Im Benzolkern ist eine CH-Gruppe durch N ersetzt. Es ist eine farblose Flüssigkeit von unangenehmem, charakteristischem



Geruch. Mit Säuren bildet es Salze, die in Wasser leicht löslich sind und mit Goldchlorid und Platinchlorid typische Doppelsalze geben. Die Base ist in kaltem Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich, in heißem Wasser dagegen schwer löslich. — Siedepunkt  $115,2^\circ$ , Spez. Gewicht ( $15^\circ$ ) 0,989. Schmelzpunkt des Platindoppelsalzes  $236^\circ$ .

Nachweis. Nach dem Gang von STAS-OTTO läßt sich Pyridin aus der natronalkalischen Lösung mit Äther ausschütteln. Um beim Verdunsten des Äthers keine Verluste zu erleiden, säuert man den zu verdunstenden Äther mit Salzsäure an.

Pyridin gibt mit den allgemeinen Alkaloidreagenzien Niederschläge.

Wird Pyridin mit Jodmethyl eingedampft, so verbleibt das Jodid einer quaternären Base. Verreibt man diesen krystallinen Rückstand mit gepulvertem Natriumhydroxyd, so entsteht ein stechender, senföhlähnlicher Geruch.

4. Cocain-Ersatzmittel. An Stelle des vielfach stark toxisch wirkenden Cocains finden synthetisch hergestellte Ersatzmittel in der Medizin Anwendung. Zu diesen zählen unter anderen: Acoïn, Anästhesin, Eucain, Holocain, Nirvanin, Novocain, Orthoform, Psicain, Stovain und Percain. Diese Ersatzmittel sind Basen, die im Gang nach STAS-OTTO aus wäßrig-alkalischer Lösung mittels Äther oder Chloroform ausschüttelbar sind. Die salzsauren

Salze geben meist mit den Alkaloidreagenzien Fällungen, wie die Alkaloide selbst. Die Basen und ihre Salze rufen Gefühllosigkeit auf der Zungenspitze hervor.

R. FISCHER<sup>1</sup> gibt eine Methode an, mittels der es gelingt, Cocain und andere synthetische Anästhetica nachzuweisen. Als Fällungsreagenzien benutzt er hierzu Trinitroresorcin, Trinitrobenzoesäure, Platinchlorid und Pikrinsäure.

Es werden krystallin gefällt durch:

1. Trinitroresorcin: Pantokain, Stovain, Larokain, Novocain, Cocain, Tutocain, Alypin und Eucaïn.

2. Trinitrobenzoesäure: Perkain, Psicain und Panthesin und ferner Eucaïn und Panthesin.

3. Platinchlorid: Psicain, Holokain, Percain, Larocain, Cocain, Psicain neu.

4. Pikrinsäure: Stovain, Pantocain, Novocain, Cocain, Larocain, Alypin und Eucaïn.

Zuerst prüft man mit Reagens 1; tritt keine Fällung ein, so geht man zu 2, 3 und 4 über. Die Schmelzpunkte der Doppelverbindungen sind charakteristisch.

Von wichtigeren Cocainersatzmitteln seien kurz aufgeführt:

a) Novocain (salzsaures p-Amidobenzoesäure-diäthylamin-äthylester),  $C_6H_4 \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{COO} \end{matrix} - CH_2 - CH_2 - N \begin{matrix} < C_2H_5 \\ < C_2H_5 \end{matrix}$ . Das salzsaure Salz ist farb- und geruchlos; die Krystallnadeln besitzen einen schwach bitteren Geschmack, sie sind in Wasser leicht, schwerer löslich in Alkohol und sehr schwer löslich in Äther. Die Base selbst ist in Wasser unlöslich, leicht dagegen in Alkohol, Äther, Benzol und Chloroform löslich. Schmelzpunkt der Base 61—63°, des Novocains 155°, des Pikrats 153°.

Reaktionen. 1. Diazoreaktion: Zu der wäßrigen Lösung des Novocains setzt man einige Tropfen verd. Salzsäure und einige Tropfen einer 0,5%igen Kaliumnitritlösung. Fügt man nun eine Lösung von  $\beta$ -Naphthol in Natronlauge zu, so tritt eine scharlachrote Färbung auf (Unterschied von Cocain und den Cocainersatzmitteln). — Anästhesin und Nirvanin geben eine ähnliche Reaktion.

2. Quecksilberchlorürprobe. Gleiche Teile Novocain und Quecksilberchlorür innig verrieben und mit einigen Tropfen verd. Alkohol versetzt, schwärzen sich nach einiger Zeit.

3. Jodoformreaktion. Auf Zusatz von Jodjodkaliumlösung scheidet sich das Novocain als brauner Niederschlag ab, der beim Erwärmen mit Natronlauge sich unter gleichzeitiger Bildung von Jodoform löst, kenntlich an dem typischen Jodoformgeruch.

4. Wird Novocain mit etwa 5%iger Quecksilberchloridlösung versetzt, so bildet sich eine weiße Fällung, die auf Zusatz von wenigen Tropfen verd. Salzsäure sich löst. Cocain gibt eine gleiche Fällung, die jedoch nicht in Salzsäure löslich ist.

5. Kaliumpermanganatlösung (1%) wird durch eine Lösung von 0,25 g Novocain in 5 ccm Wasser unter Abscheidung von Mangandioxyd zersetzt. Cocain scheidet violettes, krystallines Cocainpermanganat aus.

Physiologischer Versuch: Novocain, 1:1 in Wasser gelöst, ruft eine starke, aber kurz andauernde Anästhesie hervor.

b) Orthoform (m-Amido-p-oxybenzoesäure-methylester),  $C_6H_3 \begin{matrix} \text{COOCH}_3 \\ \text{NH}_2 \\ \text{OH} \end{matrix}$ , ist ein gelblich bis weißes Krystallpulver. Die Löslichkeit in Wasser ist sehr gering; leicht löslich ist es in Alkohol, Benzol und Chloroform, etwas schwerer in Äther. Aus weinsaurer Lösung läßt es sich nach STAS-OTTO mittels Chloroform ausschütteln. Infolge seines Phenolcharakters ist es auch aus natriumbicarbonatalkalischer Lösung ausschüttelbar. Der Geschmack des Orthoforms ist schwach säuerlich. Auf der Zunge ruft es eine schwach anästhesierende Wirkung hervor. — Schmelzpunkt 142°.

Reaktionen. 1. Diazoreaktion: Diese Reaktion wird, wie beim Novocain beschrieben, ausgeführt. Es tritt eine schöne, rote Färbung auf.

<sup>1</sup> R. FISCHER: Arch. Pharm. 1933, 271, 466.

2. Eisenchloridreaktion. Die alkoholische Lösung des Orthoforms wird durch wenig Eisenchloridlösung violett gefärbt.

3. Salpetersäureprobe. Verreibt man Orthoform mit wenig konz. Schwefelsäure und fügt einen Tropfen Salpetersäure zu, so tritt eine Rot- oder Blauviolett färbung auf, die durch Zusatz von Natronlauge in Rot übergeht.

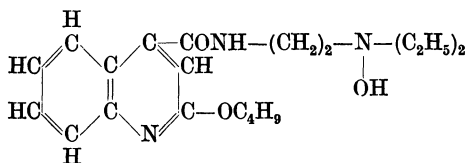
c) Stovain ist das salzsaure Salz des Benzoyl-dimethyl-aminoäthyl-isopropylalkohols:  $C_6H_5-CO-O-C \begin{cases} CH_3 \\ C_2H_5 \\ CH_2-N(CH_3)_2 \end{cases}$

Das Stovain ist ein weißes, bitter schmeckendes Pulver, das infolge seiner leichten Zersetzbarkeit schwach aminartig riecht. Auf die Zungenspitze gebracht, wirkt es anästhesierend. In Wasser ist Stovain leicht löslich, schwerer in Alkohol und Chloroform, fast unlöslich in Äther und Aceton. — Schmelzpunkt des Chlorhydrates 175—176°.

Nachweis der Benzoylgruppe. Erhitzt man das Stovain einige Minuten mit einigen Tropfen konz. Schwefelsäure und Alkohol, so tritt der typische Geruch nach Benzoesäureäthylester auf.

Permanganatreaktion. Löst man etwa 0,1 g Stovain in 5 ccm Wasser und fügt einige Tropfen Permanganatlösung (1%) hinzu, so bleibt die Flüssigkeit klar. Nach längerer Zeit scheidet sich Mangandioxyd aus. Cocain scheidet direkt violette Krystalle von Cocainpermanganat aus.

d) Percain (2 Butyl-oxycinchoninsäure-diäthyl-äthylendiamin)



Das salzsaure Salz, das als Anästheticum verwendet wird, ist in Wasser und Alkohol ziemlich leicht löslich. Die Base ist in Wasser schwer löslich, leicht jedoch in Äther. An die Zungenspitze gebracht, be-

wirkt sie Gefühllosigkeit. Aus Leichenteilen läßt sich nach dem STAS-OTTOschen Verfahren aus alkalischer Lösung die Base mit Äther ausschütteln. Der Verdunstungsrückstand wird nach einiger Zeit krystallin. Minimale Spuren Percain gehen auch aus saurer Lösung in den Äther über. — Schmelzpunkt des Chlorhydrates 97—98°.

Nachweis. Das Percain gibt mit den allgemeinen Alkaloidreagenzien Fällungen. Mit Alkaloidfarbreagenzien, z. B. konz. Schwefelsäure, MARQUIS-Reagens, MANDELIN-Reagens usw. treten keine Farbreaktionen auf.

Fluorescenzerscheinung<sup>1</sup>. Unter der Ultralampe fluoresciert das salzsaure Salz stark violett. Die gleiche Fluorescenz wird von Chininsalzen hervorgerufen. Percain gibt jedoch nicht die für Chinin charakteristische Thalleiochinreaktion.

e) Adrenalin, Suprarenin, Epinephrin (o-Dioxyphenyl-äthanol-methylamin)  $C_6H_3 \begin{cases} OH \\ OH \\ CH(OH)-CH_2 \cdot NH(CH_3) \end{cases}$

In der Nebenniere findet sich Adrenalin in seiner optisch links drehenden Modifikation vor. Das synthetisch hergestellte Präparat, Suprarenin, ist optisch inaktiv. Durch racemische Spaltung kann man l-Suprarenin herstellen, das mit dem Adrenalin identisch ist. Adrenalin läßt sich krystallisiert nur als weinsaures oder salzsaures Salz herstellen. Die Base selbst ist in Alkohol und Äther unlöslich. — Schmelzpunkt des Adrenalins 211—212°, des r-Suprarenins 208° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>19,6</sup> des Adrenalins — 51,4°.

Reaktionen. 1. Die Alkaloidfällungsmittel geben mit Adrenalin keine typischen Niederschläge, selbst nicht in konz. Lösungen.

2. Farbbildungsreaktionen. MARQUIS Reagens färbt Adrenalin rosenrot, später kirschrot. FRÖHDES Reagens färbt braun, später grünlich.

<sup>1</sup> F. RIECHEN: Z. 1932, 63, 557.

3. Reduktionserscheinungen. Jodsäurelösung wird reduziert unter Freiwerden von Jod. Phosphorwolframsäure wird grünlich gefärbt.

4. Eisenchloridreaktion. Sehr verdünnte Eisenchloridlösung färbt Adrenalin smaragdgrün; die Färbung geht auf Zusatz von Ammoniak in Blutrot über.

Keine Reaktion geben: Alypin, Anästhesin, Antipyrin, Eucain B, Euphthalmin, Exalgin, Formopyrin, Holocain, Lycetol-Base, Novocain, Orexin, Orthoformneu, Phenetidin, Piperacin, Pyramidon, Quietol, Stovain, Thallin, Tolipyrin.

Übersicht der Farbreaktionen alkaloid-ähnlicher, künstlicher Arzneimittel<sup>1</sup>.

| Arzneimittel            | Konz. Schwefelsäure | ERDMANN'S Reagens | FRÖHDE'S Reagens                     |
|-------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Acoin . . . . .         | farblos             | farblos           | schwach schmutzig grün               |
| Analgen . . . . .       | stark gelb          | wie vor           | wie vor                              |
| Nirvanin . . . . .      | farblos             | farblos           | schön blau, allmählich verschwindend |
| o-Oxychinolin . . . . . | gelb                | wie vor           | wie vor                              |
| Phenokoll . . . . .     | farblos             | wie vor           | rotgelb                              |

## D. Kampfstoffe (Giftgase).

Im Kriege wurden Giftstoffe verwendet, die folgende Wirkungen ausübten und demnach in folgende Wirkungsarten eingeteilt wurden: 1. Tränengase, 2. Reizstoffe der Schleimhäute, 3. Lungengifte und 4. Hautgifte.

Als die hauptsächlichsten Gifte seien angeführt: Chlor, Phosgen,  $\text{COCl}_2$ , Perstoff, Perchlorameisensäureester,  $\text{Cl-COO-CCl}_3$ , Chlorpikrin,  $\text{CCl}_3\text{NO}_2$ , Chloracetophenon,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-COCH}_2\text{Cl}$ , Dichlordiäthylsulfid,  $\text{S} \begin{matrix} \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl} \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl} \end{matrix}$ , Diphenylarsinchlorid,  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{AsCl}$ , Äthylarsindichlorid,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{AsCl}_2$ , Dichlordivinylarsinchlorid,  $(\text{CHCl}=\text{CH})_2\text{AsCl}$ , Diphenylaminarsinchlorid,  $(\text{C}_6\text{H}_4)_2\text{NHAsCl}$ , Diphenylarsincyanoxyd,  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{AsCN}$ .

Ein Teil dieser Stoffe, z. B. Phosgen, Perstoff usw., spalten in den feuchten Atmungsorganen Salzsäure ab, die giftig wirkt. Man wird also saure Spaltungsprodukte nachzuweisen versuchen. Bei Arsen enthaltenden Giftstoffen wird man in den Lungen nach dem Zerstören der organischen Substanz Arsen nachzuweisen können. Näheres über Giftgase ist aus der Buchliteratur: PRANDTL, GEBELE und FESSLER, ARNOLD VATTER, W. UTERMARK, H. STOLTZENBERG (Buch-Literatur S. 1437) zu ersehen.

Darüber, wie Kampfgase (Giftgase) auf Lebensmittel einwirken, ist noch wenig bekannt. Wasserreiche Lebensmittel zersetzen einige Kampfgase unter Bildung von freier Salzsäure, z. B. Phosgen und Perstoff, andere Kampfgase werden von Lebensmitteln nicht zersetzt (W. PLÜCKER<sup>2</sup>).

## E. Ptomaine.

### a) Allgemeines.

Zu den Ptomainen zählt man die aus faulenden Leichenteilen, Fleisch, durch die Tätigkeit von Bakterien bei Luftabschluß oder Luftzutritt auftretenden Zersetzungsprodukte des Eiweißes oder die in den Leichen- oder Fleischteilen vorkommenden anderen Stickstoff enthaltenden organischen Verbindungen. Auch die in normalen und pathologischen Harnen gefundenen giftigen, stickstoffhaltigen Substanzen rechnet man zu den Ptomainen. Durch die Lebenstätigkeit von Bakterien, namentlich den pathogenen Bakterien, werden Giftstoffe gebildet, die im Zelleib der Bakterien verbleiben oder in das Substrat hinaus diffun-

<sup>1</sup> Nach GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie.

<sup>2</sup> W. PLÜCKER: Z. 1934, 68, 313.



dieren. Diese Giftstoffe bezeichnet man als Toxine und zählt sie auch zu den Ptomainen.

Auch Lebensmittel, die stickstoffhaltige Substanzen enthalten, können bei ihrer Fäulnis giftige Ptomaine bilden. So können in Wurst, Käse, Fischen, Weichtieren und Fleisch, wie schon erwähnt, Ptomaine bei der Fäulnis entstehen.

Beim Beginn der Fleischfäulnis bilden sich meist Zersetzungsprodukte des Eiweißes, die keine giftigen Eigenschaften besitzen, erst nach einiger Zeit findet die Bildung giftiger Zersetzungsprodukte statt. Nach BRIEGER entsteht zuerst meist Cholin, alsdann giftiges Neuridin. Im weiteren Verlauf der Zersetzung kommen auch Diamine, z. B. Cadaverin, Putrescin u. a. vor.

In der Toxikologie verdienen hauptsächlich die Ptomaine deshalb Beachtung, weil sie infolge ihrer chemischen Eigenschaften geeignet sind, Alkaloide vorzutäuschen.

Diese Ptomaine geben, da sie zu den organischen Basen zählen, mit den allgemeinen Alkaloidreagenzien häufig Fällungen. Außerdem bilden sie Platin- und Golddoppelsalze und mit Pikrinsäure und Pikrolonsäure krystalline Verbindungen. Auch geben sie häufiger mit diesem oder jenem Spezialreagens auf Alkaloide gleiche oder ähnliche Reaktionserscheinungen, z. B. auf Strychnin.

Die meisten dieser Ptomaine müssen als primäre, sekundäre oder tertiäre Basen aus den alkalischen, wäßrigen Lösungen sich mit Äther ausschütteln lassen. Die quaternären Basen aber sind erst aus den eingedampften Auszügen durch Extraktion mit Alkohol ausziehbar.

Man stößt aber nur in seltenen Fällen auf solche Ptomaine, die Alkaloide vortäuschen können. Es ist nicht ausgeschlossen, daß ein Teil dieser Ptomaine im Gang des chemischen Nachweises sich so verändert, daß sie nicht mehr in der Ausschüttelung nach STAS-OTTO im alkalischen Teile auffindbar sind.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften sind meist gegenüber den Alkaloiden so verschieden, daß von einer Täuschung nicht die Rede sein kann, zumal wenn die Alkaloide genügend gereinigt vorliegen. Wenn die Ptomaine auch die eine oder andere Spezialalkaloidreaktion geben, so beschränkt sich diese nur auf eine Reaktion; mehrere solcher Spezialnachweisreaktionen dieses oder jenes Alkaloids zugleich gibt jedoch das Ptomain nicht. Auch physiologisch verhalten die Ptomaine sich stets anders als das betreffende Alkaloid, mit dem sie eine Spezialreaktion gemeinsam haben.

In der Regel wirken die Ptomaine im Gegensatz zu den meisten Alkaloiden reduzierend. Ferricyankalium wird sofort in Ferrocyanalkalium übergeführt. Die Ptomaine werden also auf Zusatz eines sehr verdünnten Gemisches von Eisenchlorid und Ferricyankalium eine Berlinerblauausscheidung hervorrufen. Allerdings tritt die gleiche Reaktion auch bei dem Morphin ein.

Bei den einzelnen Alkaloiden wurden bereits diejenigen Ptomaine erwähnt, die mit dem betreffenden Alkaloid einige Ähnlichkeit haben.

### b) Darstellung der Ptomaine nach BRIEGER<sup>1</sup>.

Zur Gewinnung der Ptomaine werden Fleischteile mehrmals durch eine Fleischhackmaschine getrieben und nach Zusatz von Wasser und verd. Salzsäure einige Minuten ausgekocht. Während des Kochens muß die schwach saure Reaktion bestehen bleiben. Das Ungelöste wird durch ein Koliertuch von der Flüssigkeit getrennt und diese filtriert. Das Filtrat wird alsdann auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz, am besten im Vakuum, eingedampft.

<sup>1</sup> BRIEGER: Untersuchungen über Ptomaine, III. Teil, S. 19. (Berlin 1886.)

Der Sirup wird mit 96%igem Alkohol aufgenommen, vom Ungelösten durch Filtration getrennt und das Filtrat mit warmer alkoholischer Bleiacetatlösung solange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Am besten trennt man den Bleiniederschlag von der Flüssigkeit durch Abnutschen. Das klare Filtrat wird erneut bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, dann nochmals mit 96%igem Alkohol ausgezogen, filtriert, eingedampft und mit Wasser aufgenommen. Das noch in Lösung befindliche Blei wird durch Schwefelwasserstoff gefällt, und die Flüssigkeit nach vorherigem Ansäuern mit Salzsäure erneut bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Den Rückstand nimmt man mit 96%igem Alkohol auf und setzt solange eine alkoholische Quecksilberchloridlösung zu, bis nichts mehr ausgefällt wird. Der durch Abfiltration und Auswaschen verbleibende Rückstand (A) wird mit Wasser ausgekocht. Es gehen die Ptomain-Quecksilberdoppelsalze in Lösung, die durch fraktionierte Krystallisation eine Trennung verschiedener Ptomaine gestatten.

Das alkoholische Filtrat (B) wird eingedampft, mit Wasser aufgenommen und durch Schwefelwasserstoff das überschüssige Quecksilber entfernt. Alsdann wird die saure Reaktion durch Natriumcarbonatlösung abgestumpft, die Flüssigkeit auf dem Wasserbade abgedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Die klaren alkoholischen Auszüge werden vom Alkohol befreit, der Rückstand wird in Wasser gelöst, mit Natriumcarbonat neutralisiert, alsdann mit Salpetersäure angesäuert, und nunmehr werden durch Phosphormolybdänsäure die Ptomaine gefällt. Der Niederschlag wird auf dem Wasserbade mit neutralem Bleiacetat zerlegt, die abfiltrierte Flüssigkeit durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entbleit und zum Sirup eingedampft. Dieser Sirup wird mit Alkohol ausgezogen; hierdurch können verschiedene Ptomaine als salzsaure Salze schon erhalten werden.

Zwecks weiterer Trennung und Reinigung der Ptomaine kann man die Platin-, Gold- oder Quecksilberchloriddoppelsalze herstellen, auch die Pikrate können zur Reinigung der Ptomaine benutzt werden, die mit ihnen gut krystallisierende Doppelverbindungen geben. Ferner läßt sich auch durch fraktioniertes Umkrystallisieren der Doppelverbindungen eine Trennung und Reinigung erzielen.

Goldsalze werden leicht reduziert. Derartige Doppelsalze krystallisiert man aus schwach salzsaurer Lösung um. Als Kontrolle der Reinheit dient die Bestimmung des Schmelzpunktes. Aus den Metalldoppelsalzen kann durch Schwefelwasserstoff das Metall ausgefällt, und die Chlorhydrate nach dem Eindampfen und vorheriger Filtration rein erhalten werden.

BRIEGER konnte nach dieser Methode aus faulenden Leichen Ptomaine isolieren.

Der Quecksilberniederschlag A enthält die Hauptmenge Cadaverin und Putrescin und nur wenig Mydatoxin. Cadaverin und Putrescin sind schwer löslich beim Umkrystallisieren, am schwersten das Cadaverin. In den Mutterlaugen verbleiben Verunreinigungen und Mydatoxin. Die Isolierung von Cadaverin und Putrescin geschieht in folgender Weise: Durch Schwefelwasserstoff werden die Quecksilberdoppelsalze zerlegt, das Filtrat vorsichtig eingengt und mit Alkohol behandelt, in welchem die Chlorhydrate leichter löslich sind. Durch nochmalige Überführung zuerst in die Golddoppelsalze und dann in die Quecksilbersalze lassen sich die beiden Ptomaine trennen. Von den Goldsalzen ist das Putrescin- und von den Quecksilbersalzen das Cadaverin schwerer löslich. Das Mydatoxin findet sich in den Mutterlaugen des Putrescin- und Cadaverindoppelsalzes. Durch Schwefelwasserstoff wird das Quecksilber entfernt und das Chlorhydrat in das Platindoppelsalz  $(C_6H_{14}O_2N)_2PtCl_6$  übergeführt. — Schmelzpunkt  $193^{\circ}$ .

Das Filtrat B vom Niederschlag A. Der aus dem Filtrat durch Phosphormolybdänsäure bewirkte Niederschlag wird, wie oben schon erwähnt, mit neutralem Bleiacetat zerlegt und die Lösung entbleit. Aus der alkoholischen Lösung wird ein Chlorhydrat gewonnen, das reduzierende Eigenschaften besitzt, also eine Lösung von Eisenchlorid und Ferricyankalium bläut. Aus diesem Grunde stellt man keine Golddoppelsalze her, sondern das Pikrat. Das so isolierte Mydin ( $C_8H_{11}ON$ ) bildet ein Pikrat vom Schmelzpunkt  $195^\circ$ . Die Base des Mydins ist nicht giftig, reagiert stark alkalisch und riecht ammoniakalisch.

Aus faulem Pferdefleisch gelang es BRIEGER, im Quecksilberniederschlag Cadaverin, Putrescin und Mydatoxin ( $C_7H_{17}O_2N$ ) zu isolieren. Das Goldsalz des Mydatoxins ist dimorph. Nadeln vom Schmelzpunkt  $176^\circ$ . Die Base hat, wie auch das Chlorhydrat, Curarewirkung.

Im Phosphormolybdänniederschlag des Filtrates fand er ein Ptomain, dessen Golddoppelsalz von der Formel  $C_2H_7N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$  den Schmelzpunkt  $198^\circ$  hatte. Es ist ein Methylguanidin ( $HN-C \begin{smallmatrix} \text{NH}-CH_3 \\ \text{NH}_2 \end{smallmatrix}$ ) und besitzt stark giftige Eigenschaften, es verursacht Krämpfe und Herzstillstand.

### c) Trennung von Diaminen nach UDRÁNSZKY und BAUMANN<sup>1</sup>.

Diamine lassen sich selbst in kleineren Mengen durch Überführung in die Dibenzoylverbindung voneinander trennen, z. B. Cadaverin (Pentamethyldiamin),  $NH_2(CH_2)_5NH_2$ , von Putrescin (Tetramethyldiamin),  $NH_2(CH_2)_4NH_2$ .

Bei Putrescin entsteht die Dibenzoylverbindung des Tetramethyldiamins,  $C_6H_5CO \cdot NH(CH_2)_4 \cdot NHOC_6H_5$ .

Die Ausführung ist folgende: Man bringt auf je 100 ccm der zu prüfenden Lösung 5 ccm Benzoylchlorid und 40 ccm 10%ige Natronlauge und schüttelt anhaltend solange durch, bis kein stechender Geruch nach Benzoylchlorid mehr vorhanden ist. Es ist notwendig, von Zeit zu Zeit mit Lackmuspapier zu prüfen, ob noch alkalische Reaktion vorwaltet, sonst muß noch Natronlauge zugesetzt werden. Der entstandene Niederschlag wird nach 24 Stunden gesammelt und ausgewaschen. Alsdann löst man ihn in wenig Alkohol und gießt die Lösung in Wasser. Die zunächst entstehende milchige Trübung wird nach längerer Zeit krystallin. Durch fraktionierte Krystallisation können die Dibenzoylverbindungen getrennt werden. Man löst die Krystalle in Alkohol und setzt Äther im Überschuß zu. Es krystallisiert die Putrescinverbindung aus, in der Lösung bleibt die Cadaverinverbindung. Durch mehrmalige Wiederholung der Umkrystallisation lassen sich die Verbindungen weiter reinigen. — Schmelzpunkt der Dibenzoylverbindung des Cadaverins  $130^\circ$ , der des Putrescins  $176-177^\circ$ . Durch Verseifen mit alkoholischer Kalilauge können die Basen in Freiheit gesetzt werden.

### d) Einige Ptomaine, nach GADAMER<sup>2</sup> näher beschrieben.

1. Putrescin (Tetramethyldiamin),  $H_2N-(CH_2)_4-NH_2$ . Die Isolierung nach BRIEGER ist oben (S. 1376) beschrieben worden. Putrescin ist ein Zersetzungsprodukt des Eiweißes bei der Fäulnis. Es stellt eine weiße, krystalline, hygroskopische, alkalisch reagierende Masse vor. Der Geruch ist dem des Piperidins ähnlich. Putrescin ist nicht giftig.

Von Reaktionen seien erwähnt:

1. Phosphormolybdänsäure: Gelber Niederschlag.
2. Phosphorwolframsäure: Weißer Niederschlag, im Überschuß löslich.
3. Jodjodkalium: Brauner krystalliner Niederschlag.

<sup>1</sup> UDRÁNSZKY u. BAUMANN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1888, **21**, 2744.

<sup>2</sup> GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie.

4. Pikrinsäure: Gelbe Krystalle (schwer löslich).  
 5. Platinchlorwasserstoff: Gelbe Nadeln oder sechsseitige Blättchen.  
 6. Goldchlorwasserstoff: Gelbe Blättchen; Schmelzpunkt 210°.  
 7. Dibenzoylverbindung: Weiße Krystalle; Schmelzpunkt 176—177°.

2. **Cadaverin** (Pentamethylendiamin),  $H_2N-(CH_2)_5-NH_2$ , bildet sich auch als Zersetzungsprodukt der Eiweißkörper und stellt eine weiße krystalline Krystallmasse vor, deren Geruch an Piperidin erinnert. Die Base hat alkalische Reaktion.

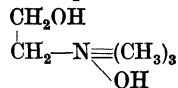
Reaktionen:

1. Phosphormolybdänsäure: Gelber krystalliner Niederschlag, im Überschuß etwas löslich.
  2. Phosphorwolframsäure: Weißer Niederschlag, der im Überschuß löslich ist.
  3. Jodjodkalium: Braune Nadeln.
  4. Wismutjodidjodkalium: Rote Nadeln.
  5. Pikrinsäure: Gelbe Nadeln; Schmelzpunkt 220—222°.
  6. Platinchlorwasserstoff: Orangegelbe Prismen; Schmelzpunkt 215°.
  7. Goldchlorwasserstoff: Gelbe Nadeln, in Wasser leicht löslich; Schmelzpunkt 186—188°.
  8. Quecksilberchlorid: Lange weiße Nadeln, schwer in kaltem Wasser löslich; Schmelzpunkt 214°.
  9. Dibenzoylverbindung: Weiße Krystalle; Schmelzpunkt 130°.
- Kaliumdichromat und konz. Schwefelsäure: Vorübergehende Rotbraunfärbung.

3. **Saprin**,  $C_5H_{14}N_2$ , ist isomer mit dem Cadaverin. Die Base ist von BRIEGER in menschlichen Leichenteilen gefunden worden. Sie gibt mit Eisenchlorid und Ferricyankalium eine Blaufärbung. Mit konz. Schwefelsäure und Kaliumdichromat bildet sich keine rotbraune Färbung.

4. **Mydalein** soll sich im Quecksilberniederschlag stark angefaulten Fleischteile vorfinden. Die Zusammensetzung ist nicht näher bekannt. Mydalein wirkt giftig. Krystallisierende Verbindungen und ihre Schmelzpunkte sind in der Literatur nicht angegeben. Eisenchlorid und Ferricyankalium sollen gebläut werden.

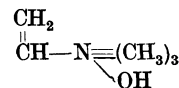
5. **Cholin** (Oxäthyl-trimethyl-ammonium-hydroxyd) (s. Formel) ist eine quaternäre Base, die aus den eingedampften Lösungen durch Alkohol extrahierbar ist. Es bildet sich zuerst bei der Fäulnis des Fleisches. Die Base zeigt alkalische Reaktion und ist ebenso wie ihr Chlorhydrat eine leicht zerfließende Krystallmasse. Das Cholin besitzt nur geringe Giftigkeit.



Reaktionen.

1. Phosphormolybdänsäure: Voluminöser Niederschlag.
2. Phosphorwolframsäure: Weißer Niederschlag, der beim Kochen krystallin wird.
3. Jodjodkalium: Brauner körniger Niederschlag.
4. Quecksilberchloridlösung: Weißer körniger Niederschlag.
5. Platinchlorwasserstoff: Rotgelbe, monokline Tafeln; Schmelzpunkt 234—235°.
6. Goldchlorwasserstoff: Gelbe Nadeln; Schmelzpunkt 244—245°.

6. **Neurin** (Trimethyl-vinyl-ammonium-hydroxyd) (s. Formel) ist eine quaternäre Base von alkalischer Reaktion. Die Base und ihr Chlorhydrat bilden zerfließliche, weiße Krystallmassen. Das Neurin wirkt stark giftig.



Reaktionen.

1. Phosphormolybdänsäure: Weißer, krystalliner Niederschlag.
2. Phosphorwolframsäure: Keine Fällung.
3. Jodjodkalium: Braune Fällung.
4. Quecksilberjodidjodkalium: Weißgelber Niederschlag.
5. Quecksilberchlorid: Weiße Niederschläge. Je nach der zugesetzten Quecksilbermenge bildet sich ein leichter lösliches Salz von der Zusammensetzung  $C_5H_{12}NCl \cdot HgCl_2$  (Schmelzpunkt 198,5—199,5) oder ein schwer lösliches Salz, das die Formel  $C_5H_{12}NCl \cdot 6 HgCl_2$  besitzt (Schmelzpunkt 230,5—234°).
6. Platinchlorwasserstoff: Oktaedrische, schwer lösliche gelbliche Krystalle; Schmelzpunkt: 195,5—198°.
7. Goldchlorwasserstoff: Gelbe Nadeln, in heißem Wasser löslich; Schmelzpunkt: 232—236°.
8. Pikrinsäure: Goldgelbe Nadeln; Schmelzpunkt: 263—264°.

7. **Neuridin**,  $C_5H_{14}N_2 \cdot 2 HCl$  (Chlorid). In stärker faulen Leichenteilen findet sich Neuridin; es ist das am häufigsten vorkommende Ptomain und wird, trotzdem es einen quaternären Basencharakter besitzt, aus alkalischer wäßriger Lösung von Äther und anderen organischen Lösungsmitteln aufgenommen und findet sich deshalb wohl im Gang nach STAS-OTTO in den alkalischen Ausschüttelungen. Bei der Isolierung der Ptomaine nach BRIEGER ist es in dem Quecksilberniederschlag auffindbar. Die Base ist leicht zersetzlich und besitzt einen unangenehmen, spermaartigen Geruch. Wird sie mit Natronlauge gekocht, so entwickeln sich gleiche Mengen Trimethylamin und Dimethylamin.

Reaktionen.

1. Phosphormolybdänsäure: Weißer, krystalliner Niederschlag.
2. Phosphorwolframsäure: Weißer, amorpher Niederschlag.
3. Wismutjodidjodkalium: Roter, amorpher Niederschlag.
4. Platinchlorwasserstoff: Das Doppelsalz ist in Wasser leicht löslich, jedoch durch Alkohol fällbar.
5. Goldchlorwasserstoff: Hellgelbe, büschelförmige Nadeln.
6. Quecksilberchlorid: Kein Niederschlag.
7. Pikrinsäure: Federförmige Nadeln, bei  $230^{\circ}$  gelbe Dämpfe bildend und bei  $250^{\circ}$  ohne zu schmelzen verkohlend.

8. **Muscarin** (Dioxyäthyl-trimethyl-ammoniumhydroxyd) (s. Formel). Das Muscarin findet sich im Fliegenpilz, dem dieser seine Giftigkeit verdankt. Eine Reihe anderer Körper bildet bei der Fäulnis Muscarin. Durch die Lebenstätigkeit von Bakterien wird Cholin in Muscarin umgewandelt. Das Muscarin ist eine quaternäre Base, die aus alkalischer Lösung nicht ausschüttelbar ist und nur durch Eindicken des Lösungsmittels und Ausziehen mit Alkohol in Lösung übergeführt werden kann. Die Base und das Chlorid bilden leicht zerfließende Krystallmassen, die beim Erhitzen mit Natronlauge Trimethylamin abspalten. Das Muscarin ist ein sehr starkes Gift; es wirkt pupillenverengend und auf das Herz ein.

Sein Platindoppelsalz ist schwer löslich und bildet Oktaeder oder gelbe Nadeln. Noch schwerer löslich ist das Golddoppelsalz.

Das Muscarin gibt keine typischen chemischen Reaktionen und kann nur an seiner physiologischen Wirkung erkannt werden.

Die aus faulendem Fisch, Muscheln und Käse isolierten Ptomaine, die zu häufigen Vergiftungen Anlaß gegeben haben, sind nicht einheitlicher Natur.

Die aus Leichen isolierten Ptomaine zeigen physiologische Wirkungen, wie sie für Vergiftungen mit Aconitin, Curarin, Codein, Colchicin, Strychnin und Veratrin typisch sind.

Dritter Teil.

## Anorganische Gifte.

### I. Metallgifte, die erst nach Zerstörung der organischen Substanz nachweisbar sind.

Zu dieser Gruppe zählen die Gifte, die nicht direkt chemisch nachweisbar sind, da sie, wie die Schwermetalle, in Leichenteilen bzw. in dem Organismus selbst an Eiweiß gebunden sind und durch Schwefelwasserstoff aus ihrer Eiweißverbindung nicht als Sulfide gefällt werden können. Nach Zerstörung der organischen Substanz kann man das giftige Metall nachweisen, unmöglich ist es jedoch, wenigstens in den allermeisten Fällen, auch die Verbindungsform dieser Metallgifte noch zu bestimmen. So genügt es z. B. bei weitem nicht zu sagen, daß in Leichenteilen bzw. im Mageninhalt Quecksilber nachgewiesen wurde. Es gibt Verbindungsformen des Quecksilbers, die ungiftig sind, da sie im Magensaft entweder unlöslich oder nur in geringer Menge bzw. in Spuren löslich sind, wie Quecksilbersulfid (Zinnober) und Quecksilberchlorür (Kalomel). Wenn Metallgifte in den zerstörten Leichenteilen nicht gefunden wurden, so erübrigt es sich selbstverständlich, nach den Verbindungsformen zu fahnden; ist aber letzteres notwendig, so muß der Nachweis in der unzerstörten Substanz versucht werden.

Alle Zerstörungsarten der organischen Substanz, des Eiweißes und auch wohl des Fettes fußen darauf, daß eine Oxydation vorgenommen wird.

Als Oxydationsmittel finden Anwendung: Chlor, Salpetersäure, Chlorsäure und ihre Salze, Schwefelsäure, Persäuren, z. B. Überschweifelsäure<sup>1</sup>, Perchlorsäure, Kaliumpermanganat, Natriumsuperoxyd, Percarbonate und Wasserstoffsuperoxyd.

Je nach der Art des Materials wird man das eine oder andere Oxydationsmittel bzw. die diesbezügliche Methode wählen. In den allermeisten Fällen braucht die Zerstörung (Mineralisierung) nicht völlig durchgeführt zu werden. Meist genügt es, wenn das Eiweiß genügend weit verändert ist; hat man jedoch die organische Substanz vollständig zerstört, wie z. B. nach der Methode von DENIGÈS, so ist die Weiterbehandlung wesentlich vereinfacht. Besondere Vorsicht ist bei Quecksilber und Arsen wegen ihrer leichten Flüchtigkeit angezeigt.

## A. Zerstörung der organischen Substanz.

### 1. Methode von FRESERIUS und v. BABO mit Salzsäure und Kaliumchlorat.

Es ist dies wohl die am meisten angewendete Methode. Man verfährt in folgender Weise: Die Organteile, Magen- und Darminhalt, Erbrochenes und sonstige Objekte werden mittels einer scharfen, vernickelten Schere zerkleinert, breiige Substanzen müssen im Mörser zerrieben werden. Diese Massen versetzt man alsdann mit soviel Wasser, daß eine sehr dünne Brühe entsteht und bringt sie in einen gut gereinigten Kolben, der so groß sein muß, daß die Flüssigkeit nur etwa stark  $\frac{1}{3}$  des Rauminhaltes beansprucht. Am besten läßt man sich mehrere Glaskolben verschiedener Größe mit gleicher Halsöffnung herstellen, auf die ein gemeinsam passender, eingeschliffener Scheidetrichter und ein Steigrohr von etwa 1 m Länge aufgesetzt werden kann. Zu dem Inhalt gibt man etwa 2—3 g Kaliumchlorat und rund 50 ccm ungefähr 12%iger Salzsäure. Alsdann ist die Mischung häufiger zu schütteln. Nachdem die Einwirkung etwa 1 Stunde in der Kälte vor sich gegangen ist, setzt man den Kolben auf ein siedendes Wasserbad und schlägt um den Kolben ein Tuch, damit der Inhalt möglichst gleichmäßig warm bleibt. Man läßt nunmehr tropfenweise eine konz. wäßrige Lösung von Kaliumchlorat zufließen und schüttelt häufiger um. Von Zeit zu Zeit fügt man noch etwa 10 ccm Salzsäure zu und führt in dieser Weise die Zerstörung solange fort, bis die organische Substanz völlig zerfallen ist, und die Flüssigkeit eine hellgelbe Farbe angenommen hat. Nach 3 Stunden ist dieser Punkt meist erreicht. Dann läßt man abkühlen, filtriert ab und wäscht das Ungelöste mit schwach salzsaurem Wasser gut aus. Die Lösung und der Rückstand, letzterer nach dem Trocknen, werden, wie auf S. 1385, 1389 beschrieben, weiter auf Metallgifte verarbeitet.

Die Zerstörung kann auch in einer Porzellanschale vorgenommen werden. Hier besteht natürlich die erhöhte Gefahr einer Verflüchtigung des Arsens und Quecksilbers.

### 2. Abänderungen der Methode von FRESERIUS und v. BABO.

a) Methode von SONNENSCHNEIN und JESERICHS. An Stelle von Kaliumchlorat verwendet JESERICHS reine Chlorsäure, die er in kleinen Mengen nach und nach der Untersuchungssubstanz auf dem Wasserbade zusetzt. Ist die Masse schwammig geworden, so wird nach und nach Salzsäure zugesetzt, bis sie genügend zerstört ist. Der einzige Vorteil dieser Methode, wenn man von einem solchen sprechen will, ist der, daß keine Kaliumsalze in die Lösung kommen.

<sup>1</sup> Z. 1932, 63, 501.

b) **Methode von VINTILESCO**<sup>1</sup>. Die fein zerkleinerte, mit Wasser verdünnte Substanz wird in einer Porzellanschale mit 10% ihres Gewichtes Kaliumchlorat versetzt und auf dem Wasserbade solange erhitzt, bis die Ammoniakentwicklung aufhört. Es wird jetzt rauchende Salzsäure in kleinen Mengen von 5 zu 5 ccm etwa alle 10 Minuten zugesetzt und zugleich die Masse fortwährend gut durchgerührt. Es genügen bei etwa 200 g Substanz 35 ccm Salzsäure. Das Erhitzen des Schaleninhaltes wird solange fortgesetzt, bis die Chlorentwicklung beendet ist, was etwa 40 Minuten dauert. Nun fügt man 10—20 ccm einer etwa 60%igen Salpetersäure hinzu und läßt die Schale noch eine Weile auf dem Wasserbade stehen. Häufigeres Umrühren ist notwendig, damit der größte Teil der Säure verdampft. In der abfiltrierten, gelblich gefärbten und stark mit Wasser verdünnten Flüssigkeit lassen sich alsdann die Metalle nachweisen. Der geringe unzerstörte Anteil besteht meist aus Fett und Fettsäuren.

c) **Methode von C. MAI**<sup>2</sup>. Die zerkleinerten Organteile werden mit Salzsäure (25%) zu einem dünnen Brei angerührt und der Masse wenig Kaliumchlorat zugesetzt. Alsdann erwärmt man in einer Porzellanschale über freier Flamme und fügt dann und wann kleine Mengen Kaliumchlorat erneut zu. Nach der Verflüssigung läßt man die Masse erkalten und trennt die Flüssigkeit von der etwa aufschwimmenden Fettschicht. Das Fett kocht man noch ein- bis zweimal mit verd. Salpetersäure aus, gibt diese Flüssigkeit zu der anderen in die Schale und fügt unter weiterem Erhitzen nun langsam kleine Mengen von Ammoniumpersulfat zu, bis der Schaleninhalt klar geworden ist und nur noch eine gelblichweiße Färbung besitzt. Das Filtrat wird dann, wie bei der Zerstörung nach FRESSENIUS und v. BABO angegeben ist, weiter verarbeitet und Schwefelwasserstoff eingeleitet.

Zur Beschleunigung des Zerstörungsvorganges werden auch wohl Mangansalze zugesetzt. KIPPENBERGER empfiehlt Manganchlorür. HALENKE, der die Zerstörung mit Schwefelsäure vornehmen läßt, empfiehlt Quecksilberoxyd, welcher Zusatz natürlich nur dann zulässig ist, wenn die Substanzen nicht auf Quecksilber geprüft werden sollen.

### 3. Methode von G. DENIGES<sup>3</sup>.

In einer Porzellanschale von etwa 2 Liter Fassungsvermögen werden die zu zerstörenden Substanzen über freier Flamme erhitzt, denen, falls sie wasserarm sein sollten, etwa 25% Wasser zuzusetzen sind. Vorher fügt man zu 100 g Substanz mindestens 250 ccm konz. Salpetersäure und 5 ccm einer 2%igen Kaliumpermanganatlösung und erhitzt über freier Flamme auf einer Asbestplatte oder im Luftbade unter häufigem Rühren solange, bis die Masse nicht mehr schäumt und zerfallen ist. Alsdann spült man sie mit 100 ccm konz. Salpetersäure in eine etwa 1 Liter fassende Schale und erwärmt bzw. kocht weiter. Ratsam ist es, einen Glasrichter über die Schale zu hängen, der in die Schale hineinpassen muß, jedoch die Flüssigkeit nicht berühren darf. Man dampft auf etwa 70—80 ccm ein, fügt der heißen Masse rasch 100 ccm konz. Schwefelsäure und nach einigen Minuten etwa 4—5mal je 5 ccm konz. Salpetersäure zu. Die Erhitzung wird nun gesteigert, damit die Schwefelsäure das oben aufschwimmende Fett zerstört. Nach einiger Zeit nimmt man die Flamme weg und fügt erneut von 2 zu 2 Minuten dreimal je 5 ccm Salpetersäure zu. Alsdann erhitzt man bis zum Kochen und läßt aus einem Scheidetrichter durch den Stutzen des umgestülpten Trichters Salpetersäure, etwa 50—60 Tropfen in der Minute, zutropfen.

<sup>1</sup> VINTILESCO: Bull. Chim. 1915, 17, 99.

<sup>2</sup> C. MAI: Z. 1902, 5, 1106.

<sup>3</sup> G. DENIGES: Journ. Pharm. et Chim. 1901, [6] 14, 241; C. 1901, II, 956.

Wenn der Salpetersäurezusatz nur noch eine gelbe Färbung hervorruft, so steigert man die Wärme, unterbricht das Zutropfen der Salpetersäure und raucht die Schwefelsäure bis auf etwa 15 ccm ab, indem man zwischendurch dann und wann die gleiche Tropfenmenge Salpetersäure zufügt. Man verdünnt nun mit ziemlich viel Wasser, wodurch die gebildete Nitrosylschwefelsäure unter Entwicklung von nitrosen Dämpfen zum Zerfall gebracht wird, dampft ein und raucht nochmals einen Teil der Schwefelsäure ab. Hierdurch werden die letzten Reste der Salpetersäure entfernt. Diese Methode wird namentlich dann Anwendung finden, wenn es sich um Arsennachweis handelt. Zum Nachweis von Quecksilber ist die Methode nicht brauchbar.

#### 4. Methode von LOCKEMANN<sup>1</sup>.

Diese Methode ist der von DENIGÈS sehr ähnlich. Die zu untersuchende Substanz wird nach und nach mit einem Gemisch von konz. Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure (5—10 Tle. konz. Schwefelsäure, 100 Tle. rauchende Salpetersäure) übergossen. Der Zusatz wird so reguliert, daß immer Mengen von 1—2 ccm nach beendeter Reaktion, also nach dem Aufhören der Schaumbildung, zugefügt werden. Für 20 g Untersuchungsmaterial genügen 10—20 ccm des Säuregemisches. Man erwärmt die Porzellanschale solange auf dem Wasserbade, bis die dunkelgefärbte Masse eine breiige Beschaffenheit und braune Farbe angenommen hat, setzt 30 g eines Gemisches aus gleichen Teilen Kalium- und Natriumnitrat zu und verdampft zur Trockene. Die resultierende, gelbe, krystalline Masse wird nach und nach in einen in einem Platintiegel befindlichen Schmelzfluß von Kalium- und Natriumnitrat eingetragen und dabei die Erhitzung des Tiegels so reguliert, daß die Schmelze im Fluß bleibt. Zum Schluß wird sie noch einige Zeit stärker erhitzt. Diese Methode hat LOCKEMANN besonders für den Arsennachweis ausgearbeitet.

#### 5. Methode von HALENKE.

Wir verfahren in der Weise, daß wir die organische Substanz in einen geräumigen KJELDAHL-Kolben bringen, zu 25 g Substanz etwa 20 g konz. Schwefelsäure zusetzen und die Mischung, die sich nur wenig erwärmt, über Nacht ruhig stehen lassen. Diese Menge Schwefelsäure ist meist ausreichend, sonst wird noch etwas zugefügt. Alsdann wird der Kolben in ein Luftbad von v. BABO gesetzt und erwärmt. Die Erwärmung muß des starken Schäumens wegen zuerst mit ganz kleiner Flamme erfolgen. Zugleich läßt man aus einem Tropftrichter langsam konz. Salpetersäure in der Weise und Menge zutropfen, daß immer braune Stickoxyddämpfe sich im Halse des Kolbens befinden. Zuerst muß man gut acht geben, weil die Masse bisweilen stark schäumt, allmählich kann die Flamme dann größer gestellt werden, wodurch die völlige Zerstörung beschleunigt wird. Man kommt so meist mit geringen Mengen Säuren aus. Der Rückstand wird im KJELDAHL-Kolben durch Erhitzen noch weiter von der Schwefelsäure befreit. Nach dem Erkalten fügt man Wasser hinzu, spült alles in ein Porzellanschälchen, verdampft das Wasser und raucht die Schwefelsäure bis auf einen geringen Rest ab. Ein ungelöster Rückstand kann von Blei, Silber (Chlorsilber), Barium und Calcium herrühren. Die Lösung kann nach dem Verdünnen mit Wasser auf Metallgifte geprüft werden, mit Ausnahme von Quecksilber, da dieses bei der Zerstörung zum Teil oder völlig flüchtig gegangen ist. Soll nur auf Arsen geprüft werden, so wird zur Trennung von etwa vorhandenem Antimon mit dem Rückstand in der Porzellanschale die MEYERSCHE

<sup>1</sup> LOCKEMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1905, 18, 416.



Schmelze mit Natriumnitrat und Natriumcarbonat durchgeführt und in der üblichen Weise (s. unten) weiter verfahren.

### 6. Methode nach TARUGI.

Leichteile, Mageninhalt usw. werden mit der gleichen Gewichtsmenge Kaliumpercarbonat gemischt und alsdann zur genügenden Durchfeuchtung noch einige Kubikzentimeter Wasser zugefügt. Nachdem das Salz etwa 12 Stunden auf die zu zerstörende Substanz eingewirkt hat, kocht man die Masse in einer geräumigen Porzellanschale und setzt, wenn notwendig, weitere Mengen Kaliumpercarbonat zu. Nach etwa einstündigem Kochen läßt man erkalten, gießt die Flüssigkeit ab, fügt ihr CAROSCHE Säure in einer Menge zu, die dem Fünffachen der angewandten Substanz entspricht und kocht dann bis zur Klärung. Um die Entfärbung zu beschleunigen, setzt man dann und wann noch kleine Mengen Ammoniumpersulfat zu. Ist die Zerstörung beendet, so läßt man die klar gewordene Lösung auf den noch in der Porzellanschale verbleibenden Rückstand tropfen. TARUGI hat die Methode für den Nachweis von Arsen ausgearbeitet. Es sollen 99,4% des zugesetzten Arsens wieder gefunden werden. Nach diesem Verfahren gelangen viel Kaliumsalze in die Lösung, was nicht von Vorteil ist. Das angewandte Kaliumpercarbonat muß frei von Arsen sein.

Für den Nachweis von Metallgiften wird wohl die Zerstörung durch Chlor bzw. Salzsäure und Kaliumchlorat oder mit Überchlorsäure zu empfehlen sein. Wenn es sich um den Nachweis von Arsen handelt, so ist die Methode nach DENIGÈS bzw. die von LOCKEMANN, die beide auf dem gleichen Prinzip beruhen, zu empfehlen. Die Zerstörung kann, wie ausgeführt, in einem KJELDAHL-Kolben vorgenommen werden.

Die Zerstörung nach FRESENIUS und v. BABO mit Salzsäure und Kaliumchlorat hat den Nachteil, daß das Fett nicht zerstört wird und ein, wenn auch geringer unzerstörter Rückstand zurückbleibt, z. B. Zinn<sup>1</sup>. Das Fett löst geringe Mengen Quecksilber auf und das Unzerstörte kann unter Umständen geringe Mengen Metalle einschließen, die dem Nachweis entgehen. Bei nicht flüchtigen Giften wird der Rückstand nach dem Trocknen mit Natriumcarbonat und Salpeter geschmolzen und werden in dieser Schmelze die Metalle nachgewiesen; bei Quecksilber ist diese Methode jedoch seiner Flüchtigkeit wegen nicht anwendbar. Durch mehrmaliges Auskochen mit verd. Salzsäure am Rückflußkühler wird Quecksilber bis auf Spuren dem Rückstand entzogen.

Wenn man bei der Zerstörung nach FRESENIUS und v. BABO am Rückflußkühler arbeitet, so kann von einer wesentlichen Verflüchtigung des Quecksilbers nicht gesprochen werden. Eine spezielle Zerstörung von organischer Substanz zur Prüfung auf Quecksilber s. S. 1409.

### 7. Zerstörung von Knochen.

Die Zerstörung von Knochen, die von den Fleischteilen befreit sind, wird in arsenfreien Einschmelzröhren, die durch einen Leerversuch auf Abgabefähigkeit von Arsen aus dem Glasfluß zu prüfen sind, durchgeführt. Die zerkleinerten Knochen werden mit 25%iger Salzsäure und etwas Kaliumchlorat versetzt. Nachdem die Einwirkung bei gewöhnlicher Temperatur beendet ist, wird die Masse, die sich im Einschmelzrohr befindet, auf 50° bis zum Erweichen der Knochen erwärmt. Ist keine Gasentwicklung mehr zu beobachten, so wird das Glasrohr zugeschmolzen und das Rohr im Wasserbade bei 100° erhitzt, bis die Masse gallertartig zerfallen ist. Damit das Rohr bei etwaigem Zerspringen kein Unheil anrichtet, umwickelt man es mit einem Tuch.

<sup>1</sup> E. DEUSSEN: Arch. Pharm. 1926, 264, 360.

## B. Allgemeiner Analysengang für metallische Gifte.

Um in Lösung befindliche Metalle nach dem Zerstören der organischen Substanz zu fassen, werden sie durch Schwefelwasserstoff in salzsaurer Lösung als Sulfide gefällt. Nachdem das Chlor zur Hauptsache durch Einleiten von Kohlensäure in der Kälte in die Lösung entfernt ist, stumpft man mit etwas reinem Natriumcarbonat oder -bicarbonat die überschüssige Säure ab, verdünnt noch mit Wasser, setzt einige Kubikzentimeter verd. Salzsäure zu und erwärmt die Lösung auf dem Wasserbade unter Einleiten von absolut reinem Schwefelwasserstoff (s. hierüber S. 1436).

Zweckmäßig verfährt man zur Fällung der Metalle in der Weise, daß man den Kolben mit einem doppelt durchbohrten Korken verschließt, durch dessen eine Bohrung das Einleitungsrohr, durch dessen andere ein Steigrohr geht. Man treibt durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in die erwärmte Lösung zuerst die Luft aus, leitet noch etwa 1 Stunde lang langsam Schwefelwasserstoff durch und senkt dann das Steigrohr unter weiterem Einleiten von Schwefelwasserstoff in die Flüssigkeit. Nunmehr nimmt man den Kolben vom Wasserbade und läßt ihn mit dem geöffneten Schwefelwasserstoffapparat verbunden über Nacht unter Schwefelwasserstoffatmosphäre stehen. Man filtriert den etwa vorhandenen Niederschlag ab.

Es ist darauf zu achten, daß die zerstörte Flüssigkeit auch in der Tat mineralaurer (salzsauer) ist; eine saure Reaktion kann auch von Oxalsäure herrühren, die aus organischen Teilen beim Zerstören sich gebildet hat. Wenn keine freie Mineralsäure vorherrscht, so kann eine Trennung der Metalle der Schwefelwasserstoffgruppe und Schwefelammoniumgruppe verhindert werden, da in oxalsaurer Lösung zum Teil Metalle der Schwefelammoniumgruppe mit ausfallen.

Es ist ratsam, auch wenn sich äußerlich keine Veränderung bemerkbar macht, die Lösung nochmals durch das gleiche Filter zu filtrieren. Meist wird das Filtrat durch Luftzutritt unter Abscheidung von fein verteiltem Schwefel trübe. Dieser ausgeschiedene Schwefel reißt noch in kolloider Lösung befindliche Metallsulfide mit nieder. Auch ist es zu empfehlen, in diese trübe Lösung noch Schwefelwasserstoff vor der Filtration einzuleiten. Gegebenenfalls ist diese Behandlung zu wiederholen, namentlich dann, wenn es sich um Arsen handelt. Der gesammelte Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoffwasser ausgewaschen und das Filtrat nach c) (S. 1388) weiter verarbeitet.

Hat man die Zerstörung der organischen Substanz unter Zusatz von Schwefelsäure ausgeführt, so ist die Schwefelsäure vorher abzurauchen und der Rückstand mit Wasser aufzunehmen, dem man etwas Salzsäure zusetzt. Eine trübe Lösung wird filtriert, und der Rückstand auf Blei, Silber und Barium geprüft (s. S. 1389). In das klare Filtrat kann man nun, wie eben beschrieben, Schwefelwasserstoff zur Ausfällung der Schwermetalle usw. einleiten.

### a) Untersuchung der in Schwefelammonium löslichen Metalle des Schwefelwasserstoffniederschlages (Arsen, Antimon, Zinn und Spuren Kupfer).

Der auf dem Filter verbliebene Rückstand wird nunmehr mit einer Lösung von gelbem Schwefelammonium behandelt. In Lösung gehen als Sulfosalze Arsen, Antimon und Zinn, ferner geringe Mengen Kupfer, sowie auch Gold und Platin.

Um aus dem Schwefelwasserstoffniederschlag Arsen, Antimon und Zinn zu entfernen, bringt man auf den Niederschlag im Filter, das sich zweckmäßig

auf einem Glastrichterchen mit Glashahn befindet, eine warme Mischung aus gleichen Teilen Schwefelammonium und Ammoniak und rührt mit einem Glasstäbchen den Niederschlag durch, damit die Schwefelammoniumlösung mit dem Sulfidniederschlag in innige Berührung kommt. Nach etwa 1 Stunde läßt man die Lösung nach Öffnen des Hahnes abtropfen und gießt erneut Schwefelammoniumlösung auf. Zuletzt wäscht man den Niederschlag mit verd. Schwefelammoniumlösung aus. Die Schwefelammoniumlösung, die fast immer eine braune Färbung hat, und das Waschwasser werden nunmehr auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, mit einigen Tropfen konz. Salpetersäure durchfeuchtet und wiederum eingedampft. Diese Behandlung wird so oft wiederholt, bis der Rückstand eine gelbe Färbung zeigt. Der noch feuchte Rückstand wird alsdann mit etwa der dreifachen Menge einer Mischung aus gleichen Teilen Natriumnitrat und entwässertem Natriumcarbonat innig vermischt und auf dem Wasserbade völlig getrocknet und pulverisiert. Diese Mischung trägt man nun nach und nach in einen glühenden Porzellantiegel ein, in dem sich etwas geschmolzenes Natriumnitrat befindet, sog. MEYERSche Schmelze, Kaliumnitrat darf hierzu nicht verwendet werden, da sonst, wegen der Löslichkeit des Kaliumpyroantimoniats, keine Trennung von Arsen und Antimon erzielt werden kann. Nachdem alles eingetragen ist, wird die Schmelze noch etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde in ruhigem Fluß gehalten. Meist ist die Schmelze farblos, sofern aber Spuren Kupfer vorhanden sind, ist sie durch unlösliches Kupferoxyd mehr oder weniger grau gefärbt. Man bringt den Tiegel nebst Inhalt in ein Bechergläschen, in dem sich etwa 50 ccm Wasser befinden. Ist der Tiegelinhalt gelöst, so wird der Tiegel herausgenommen und abgespritzt. In die trübe Flüssigkeit, deren Trübung durch aus dem Porzellantiegel gelöstes Aluminium mit herrühren kann, wird nun Kohlensäure eine kurze Zeitlang eingeleitet, damit kleine Mengen etwa gelösten Natriumstannats als Zinnsäure (Zinnoxid) völlig ausgefällt werden. Durch Filtration wird das ungelöste Zinnoxid und Kupferoxyd und ferner das unlösliche Natriumpyroantimoniat von dem gelösten Natriumarsenat getrennt. Der Niederschlag wird ausgewaschen und die wäßrige Lösung nun mit Schwefelsäure angesäuert, eingedampft und die überschüssige Säure zum Teil abgeraucht, bis dicke weiße Dämpfe von Schwefelsäure sich entwickeln. Nach dem Erkalten prüft man einige Tropfen mit Diphenylamin-Schwefelsäure oder, falls Eisen in der Lösung, mit Brucinschwefelsäure. Ist noch Salpetersäure vorhanden, so fügt man erneut Wasser zu, um die Nitrosylschwefelsäure zu zersetzen und raucht nach dem Abdampfen des Wassers wiederum solange ab, bis weiße Dämpfe sich entwickeln. Die von Salpetersäure freie Lösung kann nun auf Arsen (S. 1389) geprüft werden.

Der auf dem Filterchen zurückgebliebene, durch Filtration von Arsen getrennte Niederschlag kann Zinn, Antimon und, wenn die Schmelze grauschwarz erscheint, auch Kupfer enthalten. Man bringt das Filterchen nebst Niederschlag in einen Porzellantiegel, trocknet und verascht es vorsichtig. Alsdann setzt man die etwa fünffache Menge Cyankalium zu, schmilzt das Ganze eine Zeitlang, löst die Schmelze in Wasser und filtriert vom ungelösten Kupfer bzw. Kupferoxyd Zinn und Antimon ab. Den ausgewaschenen Rückstand behandelt man mit 10—15%iger Salzsäure, wobei Zinn als Zinnchlorid und Kupfer als Kupferchlorid sich lösen, während Antimon ungelöst bleibt. Die Anwesenheit von Kupfer wird durch eine blaue bzw. blaugrüne Farbe angezeigt.

Man filtriert das Antimon ab, löst den Filterrückstand in Königswasser, verdampft zur Trockne und nimmt den Rückstand in wenig verd. Salzsäure auf. Im Filtrat befinden sich Zinn und Spuren Kupfer. Über die Reaktionen auf Antimon, Zinn und Kupfer, siehe unter diesen (S. 1406, 1407, 1417).

**b) Untersuchung des in Schwefelammonium ungelösten Anteils des Schwefelwasserstoffniederschlages (Blei, Silber, Wismut, Kupfer, Cadmium und Quecksilber).**

Der in Schwefelammonium unlösliche Anteil enthält die Sulfide von Blei, Silber, Kupfer, Cadmium, Quecksilber, Wismut und außerdem noch mitausgefällte organische Substanz. Ist die ursprüngliche Zerstörung der organischen Substanz mit Salzsäure und Kaliumchlorat vorgenommen worden, so findet sich im Schwefelwasserstoffniederschlag kein Silber vor; es ist im unzerstörten Anteil der organischen Substanz als Chlorsilber zurückgeblieben (s. S. 1389). Um die störende organische Substanz zu entfernen, verfährt man in der Weise, daß man den Niederschlag mit Salzsäure und Kaliumchlorat schwach erwärmt, nach Lösung des Niederschlages mit Wasser verdünnt, das Chlor durch Einleiten von Kohlensäure entfernt, mit Natriumcarbonat bis zur schwach sauren Reaktion abstumpft und erneut Schwefelwasserstoff in das Filtrat einleitet. Der auf dem Filter verbleibende Rückstand kann Chlorsilber enthalten; Nachweis s. S. 1389. Dieses Verfahren ist nur bei Abwesenheit von Quecksilber anzuwenden, da immerhin, wenn sehr wenig Quecksilber vorliegt, mit dessen Verflüchtigung gerechnet werden muß; näheres siehe unter Quecksilber (S. 1409). Der erhaltene Schwefelwasserstoffniederschlag wird auf einem Filter gesammelt, gut mit Schwefelwasserstoffwasser ausgewaschen und wiederholt mit einer heißen Mischung von 1 Vol. konz. Salpetersäure und 2 Vol. Wasser übergossen.

Ungelöst bleibt Quecksilber. Der Rückstand wird ausgewaschen und in Königswasser gelöst. Es muß immer auf Quecksilber geprüft, bzw. der Niederschlag mit Königswasser behandelt werden, auch wenn er nicht rein schwarz gefärbt ist. Der Nachweis von Quecksilber geschieht wie S. 1409 unter Quecksilber angegeben.

Die salpetersaure Lösung kann Silber, Blei, Wismut, Kupfer und Cadmium enthalten. Ist mit der Anwesenheit von Silber zu rechnen, und sind Quecksilber und Cadmium nicht vorhanden, so kann man die Sulfide im Tiegel durch Verbrennen der organischen Substanz in Metalle bzw. Oxide überführen und diese in Salpetersäure lösen. Spuren Blei bleiben als Sulfate ungelöst. Die salpetersaure Lösung wird eingedampft und mit Schwefelsäure versetzt, wie nachstehend ausgeführt. Aus der vom schwefelsauren Blei befreiten Lösung wird mit Salzsäure das Silber als Chlorsilber ausgefällt. Reaktionen auf Silber, s. S. 1416. Alsdann prüft man, nach Zusatz von Ammoniak, auf Kupfer, Cadmium und Wismut, wie unten angegeben, weiter.

Man dampft die Lösung nach Zusatz von Schwefelsäure auf der Asbestplatte in einer Porzellanschale ein, bis weiße Dämpfe aufsteigen. Nach dem Erkalten fügt man langsam Wasser und die gleiche Menge Alkohol hinzu und filtriert vom Ungelösten ab. Der ausgewaschene Niederschlag enthält Blei als Bleisulfat. Nach dem Trocknen wird er mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat geschmolzen, die Schmelze in kaltem Wasser gelöst, das Ungelöste abfiltriert, gut ausgewaschen, in verd. Salpetersäure gelöst, die überschüssige Salpetersäure verdampft und der Abdampfückstand auf Blei geprüft (s. S. 1412).

Die schwefelsaure Lösung kann noch die Metalle Wismut, Kupfer und Cadmium enthalten. Durch Erwärmen wird die Lösung von Alkohol befreit und mit Ammoniak im Überschuß versetzt. Das Wismut wird als Hydroxyd abgeschieden, während Kupfer und Cadmium als komplexe Salze in Lösung gehen.

Das Wismuthydroxyd wird abfiltriert, ausgewaschen und in schwach salzsäurehaltigem Wasser gelöst. Näherer Nachweis des Wismuts s. S. 1416.

Die ammoniakalische Lösung, die noch Kupfer und Cadmium enthalten kann und bei Anwesenheit von Kupfer blau gefärbt ist, wird mit Cyankalium versetzt und in diese Lösung Schwefelwasserstoff eingeleitet. Fällt ein gelber Niederschlag von Cadmiumsulfid aus, so wird er von der Flüssigkeit abfiltriert, ausgewaschen und in verd. Säure gelöst. Weiterer Nachweis s. S. 1418. Die Cyankalium enthaltende Lösung kann noch komplexes Kupfersalz enthalten, das durch Schwefelwasserstoff nicht gefällt wurde. Zersetzt man das komplexe Salz vorsichtig durch Zusatz von Salzsäure und leitet Schwefelwasserstoff ein, so fällt vorhandenes Kupfer als Sulfid aus. Die Zersetzung muß wegen der sich bildenden Blausäure unter einem gut ziehendem Abzug vorgenommen werden. Dieses Kupfersulfid wird in Salpetersäure gelöst und dient zum weiteren Nachweis von Kupfer (s. S. 1417). Man kann auch so verfahren, daß man einen Teil der ursprünglichen ammoniakalischen Lösung mit Salzsäure ansäuert und auf Kupfer prüft.

### c) Untersuchung des Filtrates vom Schwefelwasserstoffniederschlag.

In dem Filtrat des Schwefelwasserstoffniederschlages finden sich noch die als giftig wirkend anzusehenden Metalle Zink, Chrom und Barium.

Man dampft das Filtrat auf dem Wasserbade ein; wenn hierbei eine Braunfärbung der Flüssigkeit eintritt, so setzt man zum Zerstören der organischen Substanz etwas Salzsäure und Kaliumchlorat zu, bis die Lösung wieder gelb geworden ist. Der Rückstand, der etwa 200 ccm beträgt, wird mit verd. Schwefelsäure versetzt. Nach einigen Stunden wird ein entstandener Niederschlag, der aus Bariumsulfat bestehen kann, abfiltriert, nach dem Auswaschen mit Kalium- und Natriumcarbonat geschmolzen, die Schmelze in kaltem Wasser gelöst und vom Ungelösten durch Filtration getrennt. Der gut ausgewaschene Niederschlag, der aus Bariumcarbonat bestehen kann, wird in Essigsäure gelöst und weiter auf Barium (S. 1420) geprüft.

In dem schwefelsauren Filtrat können noch Chrom und Zink enthalten sein. Durch Zusatz von Ammoniak macht man das Filtrat alkalisch und fügt solange Essigsäure zu, bis eine stark saure Reaktion vorherrscht. Alsdann setzt man noch 2—3 g Natriumacetat zu und leitet in die erhitzte Lösung Schwefelwasserstoff ein. Ein Niederschlag kann Zink enthalten. Der durch Eisensulfid meist dunkel gefärbte Niederschlag wird mit heißem Wasser ausgewaschen, in heißem Königswasser gelöst und filtriert. Zu der kalten Lösung setzt man Ammoniumchlorid und Ammoniak bis ein starker Ammoniakgeruch bemerkbar ist, läßt die Lösung etwa 1 Stunde in der Wärme stehen und filtriert vom abgesetzten Eisenhydroxyd ab. Das Filtrat, das das Zink als Zinkammonium-Doppelsalz enthält, wird wiederum mit Essigsäure sauer gemacht und nach Zusatz von 2—3 g Natriumacetat erneut Schwefelwasserstoff eingeleitet. Es fällt nun reines Schwefelzink aus, das abfiltriert, ausgewaschen, in wenig warmer Salzsäure gelöst und weiter auf Zink (S. 1418) geprüft wird.

Das Filtrat vom Schwefelwasserstoffniederschlag des Zinks wird eingedampft und mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat geschmolzen. Ist Chrom zugegen, so ist die Schmelze und auch die wäßrige Lösung von gebildetem Kaliumchromat gelb gefärbt. Man weist das Chrom noch näher nach, indem man die Schmelze in Wasser löst, das Filtrat mit Salzsäure ansäuert und nach Vertreiben der Salpetersäure durch Abdampfen mittelst Schwefliger Säure die Chromsäure zu Chromoxydsalz reduziert. Durch Zusatz von Ammoniak wird Chromhydroxyd ausgeschieden, das man nach dem Abfiltrieren und Auswaschen durch Lösen in verd. Salzsäure weiter auf Chrom prüfen kann, wie auf S. 1419 angegeben ist.

Nickel und Kobalt. Diese beiden Metalle würden, wenn sie vorhanden wären, ebenfalls im Filtrat vom Schwefelwasserstoffniederschlag sich vorfinden

und bei dem Nachweis des Zinks den Zinksulfidniederschlag schwarz färben. Wenn man aber an Stelle der Essigsäure Ameisensäure verwendet, so wird wohl etwa vorhandenes Zink durch Schwefelwasserstoff gefällt, Nickel und Kobalt dagegen nicht. Im übrigen ist Nickel und Kobalt nach dem allgemeinen analytischen Gang nachzuweisen und zu isolieren. Über den Nachweis von Selen und Uran siehe unter S. 1408, 1419.

**d) Untersuchung des bei der Zerstörung der organischen Substanz verbleibenden Rückstandes (Blei, Barium, Strontium und Silber).**

Bei der Zerstörung der organischen Substanz mit Salzsäure und Kaliumchlorat oder Perchlorsäure verbleibt ein geringer Rückstand, der noch Blei, Barium, Strontium als Sulfate und Silber als Chlorid enthalten kann. Um ihn möglichst von Fett zu befreien, wird das Filter in einen Wärmeschrank gestellt, damit das Fett abtropfen kann. Der Rückstand, der nun nicht mehr viel Fett enthält und auch trocken geworden ist, wird mit der dreifachen Gewichtsmenge Natriumcarbonat und Kaliumnitrat gemischt und nach und nach in einen geräumigen, glühenden Porzellantiegel eingetragen, in dem sich etwas geschmolzenes Kaliumnitrat befindet. Wenn alles eingetragen ist, hält man die Schmelze noch einige Zeit in Fluß, zieht sie nach dem Erkalten mit Wasser aus und leitet in die trübe Lösung etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde lang Kohlensäure ein, kocht auf und filtriert. Der gut ausgewaschene Niederschlag wird in verd. warmer Salpetersäure gelöst, zur Trockene verdampft und dann in kochend heißer verd. Salzsäure aufgenommen. Ungelöst Bleibendes würde Chlorsilber sein, das zum weiteren Nachweis erneut mit Kalium-Natriumcarbonat geschmolzen wird. Der Rückstand der Schmelze wird in Salpetersäure gelöst und durch die unter Silber (S. 1416) angeführten Reaktionen näher nachgewiesen.

Die warme salzsaure Lösung enthält nun noch Blei, Barium und Strontium. Man leitet in dieselbe Schwefelwasserstoff ein und identifiziert das Bleisulfid nach Überführung in Bleinitrat noch näher (S. 1412).

Im Filtrat vom Bleisulfid befindet sich noch etwaiges Barium als Bariumchlorid und Strontium als Strontiumchlorid die nach S. 1420 noch näher zu charakterisieren sind.

Strontium. Dieses Metall spielt eine untergeordnete Rolle; es kann nach S. 1420 nachgewiesen werden.

**C. Nachweis und Bestimmung der einzelnen metallischen Gifte.**

Über den spektroskopischen Nachweis der Metalle siehe Bd. II, Teil 1, S. 298—355 und ferner GERLACH und SCHWEIZER<sup>1</sup>. Über Mikronachweis siehe N. SCHOORL<sup>2</sup> und FEIGL<sup>3</sup>.

**1. Arsen.**

Das Arsen ist dasjenige Gift, das in seinen Verbindungen wohl am häufigsten zu Vergiftungen benutzt wird (s. Bd. I, S. 1090).

Das in der Natur als Fliegenstein oder Scherbenkobalt vorkommende Mineral oxydiert sich an der Luft unter Bildung kleiner Mengen giftigen Arsentrioxyds, das Anhydrid der Arsenigen Säure.

Arsenige Säure und ihre Salze. Die Arsenige Säure ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), ein weißes Krystallmehl, das in kaltem Wasser schwer, leichter in heißem Wasser löslich ist. Ihre Salze sind

<sup>1</sup> GERLACH u. SCHWEIZER: Die chemische Emissions-Spektralanalyse.

<sup>2</sup> SCHOORL: Zeitschr. analyt. Chem. 1907, **46**, 658.

<sup>3</sup> F. FEIGL: Quantitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. Leipzig: Akadem. Verlagsgesellschaft.

teils in Wasser, teils in Mineralsäuren löslich. Medizinische Anwendung findet das metarsenigsäure Kalium, der Liquor Kalii arsenicosi der Apotheken.

Als Malerfarbe wird das SCHEELESche Grün,  $\text{AsO}_3\text{HCu}$ , und das Schweinfurtergrün,  $(\text{AsO}_2)_3(\text{CH}_3\text{COO})\text{Cu}_2$ , gebraucht, die auch noch unter anderen Namen gehandelt werden. Auch der rote Realgar ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) und das gelbe Auripigment ( $\text{As}_2\text{S}_5$ ) haben, da sie in verd. Mineralsäuren löslich sind, giftige Eigenschaften.

Arsensäure ( $\text{AsO}_4\text{H}_3$ ) und ihr Anhydrid, Arsenpentoxyd ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ), finden in der Technik Anwendung. Sie sind, wie auch ihre Salze, ebenfalls giftig, da sie im Organismus, wenn auch langsam, zu Arseniger Säure reduziert werden.

Arsenwasserstoff ( $\text{AsH}_3$ ) ist ein schwach nach Knoblauch riechendes Gas. In Fabriken, in welchen mit unreinen, arsenhaltigen Säuren, Salzsäure, und Metallen gearbeitet wird, sind schon Vergiftungen mit Arsenwasserstoff vorgekommen. Auch Ferrosilicium soll an feuchter Luft neben Phosphorwasserstoff Arsenwasserstoff entwickeln. Arsen-Halogenverbindungen sind für die forense Chemie von nebensächlicher Bedeutung.

Organische Arsenverbindungen. In der Arzneykunde finden verschiedene organische Arsenverbindung Anwendung, auch solche werden angewendet, die neben Arsen noch Antimon und Wismut enthalten. Wichtigere Verbindungen sind: das Atoxyl, Arrhenal, Kakodylsäure, Salvarsan u. a.

Für die forense Chemie ist es wichtig zu wissen, daß wohl alle unsere Nahrungsmittel minimale Spuren Arsen enthalten<sup>1</sup>. Spuren Arsen findet man auch überall in der Erde, im Wasser usw. Normale menschliche und tierische Gewebe enthalten nach GAUTIER minimale Spuren Arsen. Auch unsere meisten Reagenzien sind nicht frei von minimalsten Spuren Arsen. Es ist deshalb erforderlich, namentlich wenn Arsenvergiftungen in Frage kommen, die zur Verwendung gelangenden Reagenzien einer ganz besonderen Prüfung auf Arsen zu unterziehen. Aus einem ganz geringen Belag in einer MARSHSchen Arsenröhre, Arsen Spiegel, kann man daher auch nicht schließen, daß nun eine Arsenvergiftung vorliegen muß. GADAMER schreibt: „Für den Chemiker ist die Tatsache des normalen Vorkommens von Arsen in unseren Nahrungsmitteln und im menschlichen Organismus von größter Bedeutung, wie bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials und der Deutung der etwa gefundenen Arsenmenge zum Ausdruck kommt.“ Eine Menge von 0,1 mg und mehr deuten auf eine Vergiftung hin.

Wenn auch Arsen langsam vom Organismus ausgeschieden wird, so verbleibt ein Teil doch lange im Organismus zurück. Bei akuten Vergiftungen mit Arsenverbindungen findet sich Arsen nicht in Nägeln, Haut, Haaren, Knochen und Röhrenknochen. Bei chronischer Vergiftung und bei längerer medizinischer Einnahme von Arsen aber wird es in Nägeln, Haut, Haaren und Röhrenknochen deponiert und wird sehr langsam wieder abgegeben, und kann auch darin nachgewiesen werden, hierzu siehe Arsennachweis in Leichenasche von M. H. REMUND<sup>2</sup>. In die Haare wandert das Arsen nur zur Lebzeit, nach dem Tode findet kein Einwandern von Arsen statt. Noch nach Jahren läßt sich Arsen in Leichenteilen nachweisen, jedoch kann es, wenn der Sarg mit der Leiche im Grundwasser steht, ausgelaugt werden, auch kann umgekehrt Arsen aus dem Grundwasser in die Leiche hinein diffundieren. Aus den Haaren der Leichen wird jedoch nach HEFFTER Arsen weder abgegeben, noch darin aufgenommen.

#### a) Vorproben bei Arsenvergiftungen.

Mit besonderer Sorgfalt sind Magen- und Darminhalt, sowie Erbrochenes auf Arsenige Säure und sonstige Arsenverbindungen zu prüfen, den Magenschleimhäuten wird man besondere Beachtung schenken. Arsenige Säure ist schwer löslich und findet sich wohl mit Schleim vermengt als weiße Streifen an der Schleimhaut. Man sucht mit der Pinzette nach Möglichkeit derartige

<sup>1</sup> Siehe Band I, S. 671, 1069, 1092.

<sup>2</sup> M. H. REMUND: Zeitschr. ges. gerichtl. Med. 1929, 13, 33; Z. 1934, 67, 457.

Schleimfäden zu isolieren. Kupferverbindungen des Arsens würden grüne Streifen hinterlassen. Die so gesammelten Partikelchen werden mit Wasser verdünnt, kräftig geschüttelt und in einem spitzen Zentrifugenglas stark zentrifugiert. So gelingt es meist, fragliche Arsenverbindungen ziemlich rein zu isolieren. Das Aussehen, ob weiß, grün oder gelb, und wenn unter dem Mikroskop Kryställchen zu erkennen sind, geben wichtige Anhaltspunkte. Man kann mit den isolierten Teilchen folgende Reaktionen anstellen:

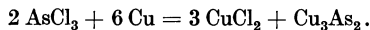
α) In ein Glühröhrchen, das auf der einen Seite in eine Spitze ausgezogen ist, bringt man eine Spur der isolierten Substanz und darüber ein Kohlesplitterchen von etwa 1 cm Länge. Nun erhitzt man das Kohlestückchen bis zum Glühen und beobachtet die Veränderung. Bildet sich oberhalb der Kohle ein schwarzer Beschlag und entwickelt sich ein Geruch nach Knoblauch, so kann Arsen vorliegen. Man sprengt nun das Glühröhrchen an der Spitze ab, so daß Luft Zutreten kann. Verflüchtigt sich der schwarze Belag, und bildet sich etwas oberhalb des Belages ein weißer Ring, der unter dem Mikroskop aus Krystallen besteht und Oktaederform erkennen läßt, so liegt Arsenige Säure vor. Antimon gibt keine Krystalle von Oktaederform. Man kann den krystallinen Ring in heißem Wasser lösen und bis auf einige Tropfen auf einem Uhrglas verdampfen. Setzt man nun 1 Tropfen Silbernitratlösung zu, so entsteht ein gelber Niederschlag von Silberarsenit ( $\text{AsO}_3\text{Ag}_3$ ).

Grüne Teilchen können aus der Kupferverbindung des Arsens bestehen. In der Spitze des Glühröhrchens bleibt in diesem Falle nach dem Glühen Kupferoxyd zurück, das sich in verd. Salzsäure löst und auf Zusatz von Ammoniak blau wird.

Rote und gelbe Teilchen können von Schwefelarsenverbindungen herrühren. Man mischt die Teilchen mit geringen Mengen einer Mischung aus Cyankalium, Natriumcarbonat und Magnesiumcarbonat. Nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bringt man die Mischung in ein Glühröhrchen, zieht das Röhrchen aus, aber so, daß keine Einwirkung der Hitze auf die Mischung stattfindet, bringt in den verjüngten Teil ein Kohlesplitterchen und glüht, wie oben beschrieben. Ein im Glasrohr sich bildender schwarzer Spiegel wird als Arsen identifiziert, wie oben angegeben.

Gelingt es nicht, Krystalle zu isolieren, so stellt man mit dem Mageninhalt oder dem Erbrochenen noch folgende Vorproben an:

β) Vorprobe nach REINSCH. Man verrührt je nach der Menge vorhandenen Arsens 1—5 g, wenn möglich mehr, des gut gemischten Mageninhaltes mit einigen Kubikzentimetern etwa 16%iger reiner Salzsäure, fügt noch etwa 10 ccm Wasser zu und erwärmt die Mischung schwach. Alsdann gießt man sie durch ein angefeuchtetes Filterchen und sammelt das Filtrat in einem kleinen Bechergläschen. In die Flüssigkeit bringt man ein Streifchen Kupferblech, das durch Salpetersäure gereinigt und zur Entfernung von Fettspurenn mit Äther abgewaschen wurde. Je nach der Menge Arsen wird das blanke Metall mehr oder weniger schnell grau; liegen erhebliche Mengen Arsen vor, so blättert die Kupferarsenverbindung schnell ab.



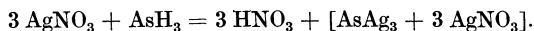
Antimon gibt eine ähnliche Reaktion.

Wäscht man den Kupferstreifen mit Wasser, Alkohol und Äther ab, rollt ihn zusammen und bringt ihn in ein Glühröhrchen, so bildet sich beim Erhitzen an den kalten Stellen bei Gegenwart von Arsen ein weißer Kranz, der zum Unterschied von Antimon Oktaederform aufweisen muß.

γ) Vorprobe nach GUTZEIT. Man stellt die gleiche Lösung wie bei der Vorprobe nach REINSCH her, nimmt jedoch an Stelle von Salzsäure reine



Schwefelsäure (1:3). Einen Teil der Lösung bringt man in ein Kölbchen von etwa 50 ccm Fassungsvermögen, setzt einige Stäbchen (etwa 2 g) reines, arsenfreies Zink zu, schiebt einen Wattepfropfen in das Glas, bedeckt das Kölbchen mit Fließpapier und gibt in die Mitte desselben mit einem Glasstab einen Tropfen konz. Silbernitratlösung oder ein Körnchen festes Silbernitrat. Wenn nach kurzer Zeit eine Gelbfärbung auftritt, so kann Arsen vorhanden sein.



Fügt man zu dem gelben Flecken Wasser, so entsteht eine unmittelbare Schwärzung. Die Reaktion ist jedoch nicht eindeutig, da Phosphorwasserstoff, Antimonwasserstoff und Schwefelwasserstoff eine ähnliche Reaktion geben. Wenn keine Gelbfärbung eintritt, so ist Arsen nicht vorhanden.

δ) Vorprobe nach GOSIO (Biologischer Nachweis). Der Schimmelpilz *Penicillium brevicaulis* besitzt die Fähigkeit, aus arsenhaltigen Verbindungen flüchtige, stark knoblauchartig riechende Arsenverbindungen zu bilden, die durch ihren Geruch leicht erkannt werden können. Nach ABEL und BUTTENBERG<sup>1</sup> bringt man etwa 5 g des Untersuchungsmaterials in einen 100 ccm fassenden Kolben und schüttelt die Masse mit etwas Wasser durch. Wenn die Reaktion sauer ist, so muß man die Masse mit etwas Calciumcarbonat anschütteln; ist sie alkalisch, so wird etwas Weinsäure zugegeben. Alsdann setzt man soviel zerkrümeltes Brot zu, bis das Wasser völlig aufgesogen ist. Der Kolben wird mit einem Wattebausch verschlossen und  $\frac{1}{2}$  Stunde in einem Autoklaven bei 1—1 $\frac{1}{2}$  Atmosphären erhitzt. Nach dem Erkalten fügt man die Pilzkultur zu, die man mit einem sterilen Platindraht vom Substrat losgelöst und in etwas steriler Bouillon aufgeschwemmt hat. Alsdann verschließt man den Kolben mit dem Wattebausch, zieht eine Gummikappe über die Öffnung und stellt ihn in einen Brutschrank von 37°. Hat sich in 24—72 Stunden ein Rasen von Pilzfäden gebildet, so wird sich bei Gegenwart von Arsen auch der typische Geruch entwickeln. (Ein ähnlicher Geruch wird auch von flüchtigen Selen- und Tellur-Verbindungen hervorgerufen.) In einem zweiten Kolben wird die gleiche Reinkultur mit Brot angesetzt, jedoch ohne das fragliche Objekt und in einem dritten Kolben fügt man außer diesen Zutaten 0,1 mg Arsenige Säure zu. Der zweite Kolben darf keinen typischen Geruch aufweisen, während in dem dritten Kolben ein deutlich knoblauchartiger Geruch auftreten muß, der wahrscheinlich von Diäthylarsin  $[\text{As}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}]$  herrührt. Der Pilz muß nach ABEL und BUTTENBERG schnell wachsen und darf keine Gerüche entwickeln.

#### b) Nachweis des Arsens.

Wie bereits auf S. 1381 ausgeführt, kann man verschiedene Methoden zur Zerstörung der organischen Substanz anwenden. Die Substanz ist vermittels einer guten Schere sehr fein zu zerkleinern. Handelt es sich um den direkten Arsennachweis, so wird man sich vorteilhaft der Methode von DENIGÈS oder LOCKEMANN bzw. der angeführten Abänderung oder einer anderen angegebenen Methode bedienen. Um das Antimon sicher auszuschalten, muß die Schmelze mit Natriumcarbonat und Natriumnitrat, MEYERScher Schmelze, durchgeführt werden, näheres siehe S. 1386.

α) Nachweis nach MARSH. Dieser ist immer noch der beste und sicherste Nachweis. Die MEYERSche Schmelze wird, wie S. 1386 ausgeführt, von Salpetersäure befreit. Die konz. Schwefelsäure und gegebenenfalls Arsen enthaltende Lösung wird mit soviel Wasser verdünnt, daß etwa 25 ccm Flüssigkeit resultieren.

<sup>1</sup> ABEL u. BUTTENBERG: Zeitschr. Hygiene 1899, 32, 449.

Der MARSHSche Apparat (Abb. 15) besteht aus einer Entwicklungsflasche, die durch einen dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen ist. Die Entwicklungsflasche darf nicht zu groß sein, ein Fassungsvermögen von 150–200 ccm reicht völlig aus. Durch die eine Bohrung führt ein Heberrohr bis auf den Boden des Gefäßes, in der zweiten Bohrung befindet sich ein Trichterrohr mit Hahn, das ebenfalls bis auf den Boden des Gefäßes reicht. Die dritte Bohrung ist mit einem rechtwinkligen Gasableitungsrohr versehen, an das ein U-Rohr anschließt, das mit Chlorcalcium und mit einigen Kalihydratstückchen angefüllt ist. An dieses Rohr ist mittels Gummischlauch ein dreimal verengtes, schwer schmelzbares Rohr von etwa 4 mm Durchmesser angeschlossen, dessen Ende in eine aufgebogene, etwa 10 cm lange Spitze endet. Die nicht ausgezogenen Stellen des Rohres ruhen auf Eisenringen und können durch Bunsenflammen erhitzt werden.

Der Kolben enthält etwa 15–20 g chemisch reines, arsenfreies, granuliertes oder in Stangen gegossenes Zink. Das Zink darf keine anderen Metalle, wie z. B. Eisen, Blei, enthalten. Zur besseren Entwicklung des Wasserstoffs ist zu empfehlen, 1–2 kleine Stückchen Zink ganz kurze Zeit in eine sehr stark

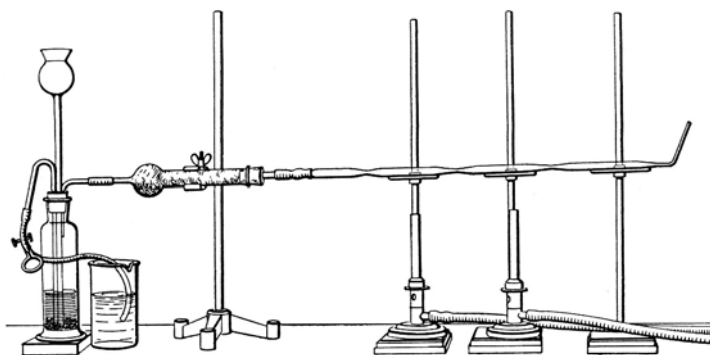
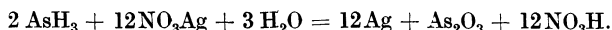


Abb. 15. Nachweis von Arsen. (Nach MARSH.)

verdünnte Kupfersulfatlösung zu legen und nach gutem Abspülen in die Entwicklungsflasche zu bringen. Das Kupfersulfat muß durch mehrmaliges Umkrystallisieren vorher gereinigt werden. Alsdann fügt man etwa 10 ccm verdünnte, arsenfreie Schwefelsäure (1 + 8) zu. Über das aufgebogene Ende der schwer schmelzbaren Röhre stülpt man ein Reagenzglas. Nachdem etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde die Entwicklung ruhig vor sich gegangen ist, hält man das Reagenzglas an eine Bunsenflamme. Tritt keine Explosion (Knall) ein, so ist alle Luft aus dem Apparat verdrängt, andernfalls muß man noch warten und den Versuch wiederholen. Ist der Apparat nun luftfrei, so stellt man unter die nicht verjüngten Stellen des Rohres Bunsenbrenner und reguliert die Temperatur so, daß die Röhren wohl glühen, aber nicht erweichen. Man läßt die Wasserstoffentwicklung nun 2 Stunden lang gehen. Ist sie zu heftig, so setzt man das Gefäß in kaltes Wasser und fügt, wenn nötig, etwas Eis zu. Nach dieser Zeit darf sich nicht die geringste Schwärzung hinter der geglühten, also an der verjüngten Stelle des Rohres bilden. Ist dieses der Fall, so sind die Reagenzien genügend rein, arsenfrei, und man kann nun zum eigentlichen Arsennachweis schreiten. Man fügt von der vorbereiteten Lösung, die man noch mit verd. Schwefelsäure weiter verdünnt hat, etwa  $\frac{1}{5}$  durch den Trichter dem Entwicklungsgefäß zu. Sind größere, also toxische Mengen Arsen vorhanden, so macht sich schon nach kurzer Zeit an der ersten verjüngten Stelle des Rohres ein dunkler Anflug bemerkbar. Man nimmt jetzt die Flamme weg und zündet den Wasserstoff an der ausgezogenen Spitze des Rohres an. Ist Arsen vorhanden, so brennt die Flamme blau. Man hält nun in die Flamme nacheinander mehrere Porzellanschälchen und erzeugt auf diesen Flecken, die

man zur weiteren Identifizierung benutzt. Der Arsenwasserstoff wird durch die angedrückte Schale abgekühlt, und da nun die Temperatur zur Verbrennung des Wasserstoffs nicht ausreicht, so scheidet sich Arsen in Flecken als fester Arsenwasserstoff ( $\text{AsH}_3$ ) ab. Alsdann löscht man die Flamme aus und stellt den Geruch fest. Ist der Geruch knoblauchartig, so ist ein weiterer Beweis, daß es sich um Arsen handelt, erbracht. Antimonwasserstoff riecht nicht nach Knoblauch. Leitet man das Gas in eine Silbernitratlösung, so scheidet sich schwarzes Silber ab.



Nun kann man die Bunsenbrenner wieder unter das schwer schmelzbare Rohr stellen und weiter Arsen im Rohr niederschlagen. Nach und nach fügt man den Rest der fraglichen Lösung zu.

| Verhalten des Spiegels<br>(oder der Flecken)                   | Arsen  | Antimon   |
|--|--|---|
| Bildung  | Nach der Erhitzungsstelle  | Vor und hinter der Erhitzungsstelle   |
| Aussehen   | Glänzend schwarz. In dünneren Schichten braunschwarz   | Schwarz, samtartig, glanzlos  |
| Beim Erhitzen im Wasserstoffstrom                              | Leicht beweglich   | Schwer beweglich. Zusammenschmelzen zu kleinen Kügelchen  |
| Beim Glühen unter Luftzutritt                                  | Mikroskopisch weiße Oktaeder, die aus Arseniger Säure bestehen, erkennbar. (Sehr wichtig!)   | Bildung einer amorphen weißen Masse von Antimonoxyd ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ )   |
| Gegen Natriumhypochloritlösung                                 | Leicht löslich<br>$2 \text{As} : 3 \text{ClONa}$<br>$= \text{As}_2\text{O}_3 + 3 \text{NaCl}$ .<br>(Sehr wichtig!)                                   | Unlöslich (wenigstens die Flecken als solche)   |
| Beim Erhitzen und Überleiten von trockenem Schwefelwasserstoff | Bildet gelbes Arsentrisulfid ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), unlöslich in trockenem Salzsäuregas  | Bildet orangefarbiges oder schwarzes Antimontrisulfid ( $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ), löslich in trockenem Salzsäuregas  |
| Salpetersäure vom Spez. Gewicht 1,3                            | Die Flecken lösen sich ziemlich leicht zu Arsenitrioxyd ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) <sup>1</sup>   | Die Flecken werden zu Antimonoxyd ( $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ) oxydiert <sup>2</sup>   |
| Leitet man das Gas in verd. Silbernitratlösung,                | so scheidet sich metallisches Silber ab und geht Arsenige Säure in Lösung. Das Filtrat gibt, mit Ammoniak überschichtet, gelbes Arsenigsaures Silber | so scheidet sich Antimonsilber ( $\text{SbAg}_3$ ) ab. Durch dessen hydrolytische Spaltung entsteht Antimonige Säure unter Abscheidung von metallischem Silber. Beim Überschichten des Filtrates mit Ammoniak tritt keine Änderung ein. |

<sup>1</sup> Fügt man einen Tropfen Silbernitratlösung zu und läßt von der Seite her Ammoniak vorsichtig zufließen, so entsteht an der Berührungszone eine gelbe Zone von arsenigsaurem Silber ( $\text{AsO}_3\text{Ag}_3$ ). Wird die Lösung mit der Salpetersäure erwärmt, so bildet sich Arsensäure ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ), die, wie bei der Arsenigen Säure mit Silbernitrat und Ammoniak behandelt, einen rotbraunen Flecken gibt.

<sup>2</sup> Läßt man die Salpetersäure verdunsten, fügt ammoniakalische Silberlösung zu und erwärmt, so scheidet sich metallisches Silber unter Schwärzung ab.

Der weitere Nachweis des ausgeschiedenen Arsens wird in vorstehender Weise geführt; zum Unterschied von Antimon ist in vorstehender vergleichenden Zusammenstellung das Verhalten des Antimon- und Arsenspiegels angegeben.

Es sei noch auf einige Fehlerquellen bei dem Nachweis des Arsens durch die MARSHsche Probe hingewiesen. Die nach MARSH zu prüfende Substanz darf kein Quecksilber enthalten; dieses muß vorher nach den allgemeinen Methoden entfernt werden. Die komplexen Quecksilber-Arsen-Verbindungen können nach KÜHL und SZYZEWSKY<sup>1</sup> unter Benutzung elektrolytischer Amalgamierung und an Hand der Sublimationsbilder Arsen und Quecksilber nachgewiesen werden. Gleiches gilt von Wismutsalzen. Ferner darf die Entwicklung nicht zu heftig sein, und die Entwicklungsflüssigkeit sich nicht zu stark erwärmen, da sich sonst Schwefelwasserstoff bilden kann, der beim Glühen zerfällt und Schwefel in den kälteren Stellen des Glühröhrchens absetzt. Selen und Tellur bilden ebenfalls mit nascerendem Wasserstoff flüchtige Verbindungen, die auch im Glühröhr bräunliche Niederschläge geben. Man kann diese Gase durch Einschalten eines Rohres, das mit Bleiacetat angefeuchtete Bimsteinstückchen enthält, zurückhalten. Ferner sollen organische Arsenverbindungen, die jedoch durch Salpetersäure und Schwefelsäure und auch durch die MEYERSche Schmelze nicht zerstört werden, im Glühröhr gleichfalls Niederschläge geben, die allerdings gelbrot aussehen. Nach VITALI kann durch Aktivierung des Zinks mit Platinchlorid diese Ringbildung von flüchtigen, organischen Arsenverbindungen verhindert werden; wenigstens bei den Alkylarsenverbindungen ist dieses der Fall.

Ist Arsen im Magen- und Darminhalt und auch in den edleren Organen, Herz, Leber, Milz, Niere, Hirn, und auch im Urin festgestellt worden, so ist es notwendig, auch Haare, Nägel und Haut auf Anwesenheit von Arsen zu untersuchen. Hierzu sind die verfeinerten Methoden des Nachweises (S. 1399) anzuwenden. Auch ist eine quantitative Bestimmung des Arsens nach S. 1400 auszuführen.

β) **Nachweis der Verbindungsform.** Ist im Magen- bzw. Darminhalt oder Erbrochenen Arsen gefunden worden, so ist es wichtig festzustellen, soweit solches möglich ist, in welcher Verbindungsform das Arsen vorliegt. Vielfach findet man im Magen weiße Krystalle; geben diese beim Erhitzen in einem Glühröhrchen ein Sublimat von weißen, unter dem Mikroskop feststellbaren Oktaedern, die, wenn man in das Glühröhrchen ein Kohlenstückchen schiebt, das fast bis an das Sublimat reicht, und nun die Kohle erhitzt, einen schwarzen glänzenden Spiegel bilden, so liegt Arsenige Säure vor. Grüne Kryställchen, die beim Glühen ebenfalls ein weißes Sublimat von oktaedrischen Krystallen geben, lassen auf die Anwesenheit von Kupferarsenat schließen. Im Glührückstand kann man dann Kupfer nachweisen, während das Sublimat, wie eben beschrieben, über Kohle erhitzt, einen Arsenspiegel bildet, siehe S. 1391. So kann es gelingen, bei Arsenvergiftungen diese oder jene Verbindungsform festzustellen.

γ) **Prüfung der Friedhofserde.** Handelt es sich um eine exhumierte Leiche, in der man Arsen nachgewiesen hat, so ist es wichtig festzustellen, ob die Friedhofserde Arsen enthält. Man entnimmt Erdproben aus verschiedenen Tiefen, am Kopfende, Fußende und der Mitte, wo der Sarg aufgestanden hat. Steht der Sarg im Grundwasser, so ist auch solches zu erheben.

Die Erdproben, in Menge von etwa 200 g, werden mit Wasser ausgekocht. In diese Lösung wird nach dem Zerstören mit Salzsäure und Kaliumchlorat Schwefelwasserstoff eingeleitet und ein entstehender Niederschlag durch seine Löslichkeit in Schwefelammonium und die MEYERSche Schmelze nach MARSH auf Arsen geprüft.

In gleicher Weise werden Auszüge der Erden mit Ammoniumcarbonat und Schwefelammonium hergestellt und auf Arsen geprüft. Ergibt sich die Abwesenheit von Arsen, so ist daraus zu schließen, daß Arsen durch die Erde, bzw. das Grundwasser, falls der Sarg in solchem gestanden hat und dieses eben-

<sup>1</sup> KÜHL u. SZYZEWSKY: Pharm. Zentralh. 1934, 75, 660.

falls frei von Arsen ist, nicht in die Leiche gelangt sein kann. Seine Bestätigung findet dieses ferner noch, wenn auch die Hobelspäne, auf der die Leiche gelegen hat, frei von Arsen sind. Aus der Leiche kann bei der Verwesung Arsen in dieselben gelangen s. S. 1406 unter Antimon.

Ist in der Erde Arsen nachgewiesen, so bleibt nichts anderes übrig, als einen Tierkadaver in unmittelbarer Nähe des Grabes zu vergraben und diesen nach einigen Monaten auf Arsen zu prüfen.

d) **Prüfung auf organische Arsenverbindungen.** Wird in Leichenteilen Arsen gefunden, so kann es von organisch gebundenem Arsen herrühren. In den letzten 20 Jahren werden solche Arsenverbindungen (Salvarsan, Atoxyl usw.) in großer Menge in der Heilkunde subcutan oder intravenös angewendet. Da diese prozentual viel Arsen enthalten, so können hierdurch unter Umständen große Mengen Arsen in Leichen festgestellt werden, ohne daß es sich um eine Arsenvergiftung handelt. Noch nach Monaten findet man Arsen in solchen Leichen. Das intravenös und subcutan einverleibte Arsen wird meist in Leber, Milz und Nieren abgelagert.

Nach GADAMER<sup>1</sup> lassen sich die organischen Arsenverbindungen in zwei Gruppen einteilen: Zu der ersten Gruppe gehören die Verbindungen, die gegen Salzsäure und Kaliumchlorat nicht beständig sind. Zu ihnen zählen die Verbindungen, welche die Atoxylgruppe enthalten, sowie Salvarsan, Neosalvarsan und Silbersalvarsan, die schon im Organismus zum Teil zerlegt und in der forensen Analyse zu Mineralarsen aufgespalten werden.

Die organischen Arsenverbindungen der zweiten Gruppe, die Methylarsensäuren usw., werden durch Salzsäure und Kaliumchlorat nicht in Mineralarsen übergeführt und können von den Verbindungen der ersten Gruppe durch Schwefelwasserstoff getrennt werden, welcher nur das Mineralarsen ausfällt. Dieser Gruppe kommt therapeutisch nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

$\alpha$ ) Atoxyl-Gruppe: Atoxyl (p-Amidophenyl-arsinsaures Natrium),  $\text{NH}_2\text{—C}_6\text{H}_4\text{AsO} < \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{ONa} \end{smallmatrix} + 4\text{H}_2\text{O}$ , Arsacetin (p-Acetyl-amidophenyl-arsinsaures Natrium),  $[\text{CH}_3\text{CO}]\text{NHC}_6\text{H}_4\text{AsO} < \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{ONa} \end{smallmatrix} + 4\text{H}_2\text{O}$ , oder Kondensationsprodukte mit Aldehyden oder Ketonen können nicht vorhanden sein, wenn nach dem Zerstören mit Kaliumchlorat und Salzsäure kein Arsen gefunden wurde. Wird Arsen gefunden, so ist festzustellen, ob Mineralarsen oder organisch gebundenes Arsen bzw. ein Gemisch vorliegt.

1. Schwefelwasserstoff fällt aus Atoxyl-Verbindungen Schwefelarsen erst bei langer Einwirkung. Wird eine Atoxylverbindung durch Schweflige Säure reduziert, so tritt durch Schwefelwasserstoff eine gelbe bis orangegelbe Fällung ein. Wird dagegen Schwefelwasserstoff in eine stark salzsaure Atoxylverbindung eingeleitet, so entsteht ein weißer, krystalliner Niederschlag, der die Phenylamidogruppe noch enthält und Diazoreaktion gibt.

2. BETTENDORFFS Reagens gibt allmählich, beim Erwärmen schneller einen citronengelben Niederschlag.

3. Die REINSCHSche Probe ist positiv, jedoch langsamer als bei Mineralarsen.

4. Die MARSHSche Probe ist ebenfalls positiv wie bei Mineralarsen.

5. Im Chlorstrom destilliert, liefert Atoxyl kein flüchtiges Arsen ( $\text{AsCl}_3$ ), fügt man jedoch Eisenchlorürlösung zu, so destilliert Arsen über. Die Derivate des Atoxyls müssen erst durch Erhitzen mit Säure in Atoxyl aufgespalten werden.

6. Atoxyllösung wird mit einigen Tropfen Natriumnitritlösung versetzt und mit Salzsäure angesäuert. Die so gebildete Diazoverbindung gibt mit salzsaurem  $\alpha$ -Naphthylamin eine purpurrote und mit  $\beta$ -Naphthylamin eine ziegelrote Färbung und nachfolgenden roten Niederschlag. Diese Reaktion ist in rein wäßrigen Lösungen nicht eindeutig wegen der überschüssigen salpetrigen Säure. Für den Nachweis von Arsen im Harn kann sie jedoch benutzt werden, da der Harnstoff die Salpetrige Säure zersetzt. Der Harn wird zuvor durch Tierkohle in schwach schwefelsaurer Lösung entfärbt. Die Reaktion ist alsdann, wie eben beschrieben, auszuführen.

<sup>1</sup> GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie.

Wird der Diazolösung eine alkalische Phenollösung, z. B. Resorcin, bis zur alkalischen Reaktion zugesetzt, so entsteht eine purpurrote Färbung.

Diese Reaktionen beweisen nicht die Anwesenheit von Arsen, sondern nur die Gegenwart aromatischer Amidverbindungen. Den obigen sich gebildeten Niederschlag kann man sammeln, auswaschen und mit Natriumnitrat schmelzen. Ist Arsen vorhanden, so wird dasselbe mineralisiert und kann nach MARSH nachgewiesen werden.

Organteile zieht man nach der Zerkleinerung mehrere Stunden mit dem mehrfachen Volumen Alkohol aus und setzt dem Auszug soviel verd. Schwefelsäure zu, daß eine schwach saure Reaktion vorherrscht. Der Auszug wird auf dem Wasserbad bis zum Sirup eingeeengt und mit soviel Alkohol versetzt, bis keine Ausfällung mehr stattfindet. Das klare Filtrat wird wiederum auf dem Wasserbade bis zur Entfernung des Alkohols eingeeengt und mit Wasser aufgenommen.

Mit der Lösung stellt man folgende Versuche an:

Die Lösung wird nach REINSCH oder MARSH auf Arsen geprüft. Verläuft die Reaktion negativ, so ist kein Atoxyl vorhanden. Ist Arsen zugegen, so wird zu einem Teil der Lösung direkt nach Zusatz von Salzsäure und zu dem anderen Teil nach Zerstörung mit Salzsäure und Kaliumchlorat BETTENDORFFS Reagens zugesetzt und die Lösungen alsdann schwach erwärmt. Gibt nun die direkte Lösung keine Reaktion oder nur einen citronengelben Niederschlag, die zerstörte Lösung aber einen braunen Niederschlag, so ist kein Mineralarsen, wohl jedoch Atoxyl oder eines seiner Derivate vorhanden, was noch durch die Reaktionen 6 entschieden werden kann. Bei den Reaktionen sind die Nitritüberschüsse durch Zufügen von Harnstoff zu zerlegen, bevor Naphthylamin zugesetzt wird. Arsacetin und Aldehydkondensationsprodukte müssen vorher durch Alkalien oder Mineralsäure zerlegt werden. Die letzteren Verbindungen können durch ihre gelbe oder orangerote Farbe noch unterschieden werden.

Gibt BETTENDORFFS Reagens sowohl mit der ursprünglichen, als auch mit der oxydierten Lösung eine braune Abscheidung, so kann neben Mineralarsen Atoxylarsen vorhanden sein. Dieser Fall ist von praktischer Bedeutung, da Atoxylarsen und Arsacetin usw. durch die Diazoreaktion erkannt werden können, die letzteren jedoch erst nach vorheriger Behandlung mit Mineralsäuren, d. h. nach Umwandlung in Atoxyl.

$\beta\beta$ ) Salvarsan-Gruppe. Diese Gruppe unterscheidet sich analytisch nur wenig von den Verbindungen der Atoxylgruppe. Im Salvarsan (Diaminodioxy-arsenobenzol-hydrochlorid),  $(\text{HO})\text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2) \cdot \text{As} = \text{As} \cdot (\text{HN}_2)\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH}) \cdot 2\text{HCl} \cdot (2\text{H}_2\text{O})$ , liegt dreiwertiges Arsen vor.

Aus seinen Lösungen wird es durch Schwefelwasserstoff nicht gefällt. Durch BETTENDORFFS Reagens wird ein gelber, amorpher Niederschlag erzeugt, der sich in der Wärme löst und beim Erkalten sich wieder abscheidet. Die REINSCH- und MARSH-Probe verlaufen positiv. Die nach REINSCH erhaltene Lösung ist dunkelrot, der auf dem Kupfer entstandene Arsenniederschlag ist mit einem leicht abwischbaren roten Überzug bekleidet. Im Chlorwasserstrom destilliert auch ohne Reduktionsmittel Arsen über. Durch Eisenchloridlösung wird Salvarsanlösung verfärbt. Die Farbe geht von Grün in Rot über. Als Reduktionsmittel ruft Salvarsan in Goldechloridlösung eine intensiv rote Färbung hervor, eine Phosphormolybdänlösung wird intensiv blau gefärbt. Durch Jodlösung wird Salvarsan zu Amidophenolarsinsäure  $([\text{HO})\text{C}_6\text{H}_3[\text{NH}_2]-\text{As} \ll [\text{OH}]_2)$  oxydiert. Diese Reaktion ermöglicht, Salvarsan quantitativ zu bestimmen, da 8 Jod 1 Mol. Salvarsan oxydieren. Die Diazoreaktion kann bei Salvarsan nur mit  $\alpha$ -Naphthylamin durchgeführt werden, während Atoxyl sie auch mit  $\beta$ -Naphthylamin gibt. Man kühlt eine mit etwas Salzsäure versetzte Salvarsanlösung auf  $0^\circ$  ab und fügt Natriumnitritlösung (0,5%) in geringem Überschuß zu. Um überschüssige Nitritlösung zu zerstören, setzt man Harnstofflösung in kleinen Mengen zu, bis Jodkalium-Stärkepapier durch einen Tropfen nicht mehr gebläut wird und gibt eine wäßrige, mit Salzsäure angesäuerte, gesättigte  $\alpha$ -Naphthylaminlösung zu. Eine rubin- bis violettrote Färbung zeigt Salvarsan an. Durch Erwärmen wird die Intensität der Färbung erhöht und die Reaktion beschleunigt. Diese Reaktion ist nur im Verein mit den anderen Reaktionen, vor allem dem Arsennachweis als solchem, eindeutig, da die Diazoreaktion für sich nur die Aminogruppe anzeigt.

Infolge der leichten Zersetzbarkeit des Salvarsans gelingt es nicht, solches in Leichenteilen, Geweben und Harn nachzuweisen. Es kann im Harn der Nachweis der gebildeten Oxyaminophenylarsinsäure versucht werden.

Nach ABELIN<sup>1</sup> wird die Reaktion, wie eben beschrieben, ausgeführt, jedoch braucht das überschüssige Nitrit nicht durch Harnstoffzusatz zerstört zu werden, da solcher schon im

<sup>1</sup> ABELIN: Münch. med. Wochenschr. 1911, 1002.

Urin vorhanden ist; für die Kupplung der Diazoverbindung wird 1%ige alkoholische Resorcinlösung verwendet. Die Reaktion kann als Zonenreaktion ausgeführt werden, wenn man die Resorcinlösung mit dem Harngemisch überschichtet. Es entsteht eine dunkle Färbung, Atoxyl gibt nur eine Orangefärbung. Die quantitative Bestimmung des Arsens in Salvarsanlösungen läßt sich nach dem Zerstören der Substanz nach DENIGÈS oder LOCKEMANN oder im KJELDAHL-Kolben durchführen; siehe hierüber quantitative Bestimmung von Arsen (S. 1400).

$\gamma\gamma$ ) Methylarsinsäure-Gruppe. Zu ihnen zählen Arrhenal, Monomethylarsinsaures Natrium ( $\text{CH}_3\text{As}\llcorner_{[\text{ONa}]_2}^{\text{O}} + 6\text{H}_2\text{O}$ ) und die Kakodylsäure, Dimethylarsinsaures Natrium ( $[(\text{CH}_3)_2\text{As}\llcorner_{[\text{ONa}]_2}^{\text{O}} + 2\text{H}_2\text{O}]$ ).

Durch Salzsäure und Kaliumchlorat werden die Methylarsinverbindungen nicht zerstört und sind deshalb durch Schwefelwasserstoff als Arsensulfid nicht fällbar. Die Kakodylsäure geht aber in Kakodylsulfid ( $\text{As}_2[\text{CH}_3]_4\text{S}$ ) über, das sich durch seinen furchtbaren Geruch charakterisiert.

Kakodylsäure liefert bei der Prüfung nach MARSH einen gelbroten Ring unter Entwicklung weißer Dämpfe, Arrhenal gibt einen dem Arsen ähnlichen Arsenring.

Die Leichteile werden mit angesäuertem Alkohol ausgezogen, der Alkohol verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und folgende Reaktionen ausgeführt:

| Reagens  | Kakodylsäure  | Arrhenal   |
|--|---|--|
| 1. Zink und Schwefelsäure  | Nach einiger Zeit weiße Dämpfe, sehr starker Geruch nach Kakodyloxyd  | Keine weißen Dämpfe; allmählich wird die Flüssigkeit gelbgrün. Im oberen Teil des Reagensrohres weißes Sublimat, das nach Aufhören der Reaktion rot wird |
| 2. BOUGAULTSches Reagens<br>20 g Natriumphosphat in 20 ccm Wasser gelöst, mit 200 ccm Salzsäure ( $d = 1,17$ ) versetzt und filtriert. | In der Wärme sofort, langsam in der Kälte milchig getrübt; entwickelt weiße Dämpfe unter Bildung eines rotbraunen Sublimates in den oberen Teilen des Reagensrohres | Trübt sich in der Kälte und nimmt langsam Rotfärbung an. In der Wärme entsteht zunächst ein weißgrauer, dann brauner Niederschlag                        |
| 3. Zehnfache Menge Phosphorige Säure ( $d = 1,15$ )  | Sofort einen intensiven Kakodyloxydgeruch   | Kein Kakodylgeruch   |
| 4. BETTENDORFFS Reagens  | Weißer Dämpfe und Knoblauchgeruch; keine Färbung  | Zunächst keine Reaktion oder gelbe Färbung. Bei längerem Erhitzen an den oberen Teilen des Rohres ein weißes, dann gelbes, endlich braunes Sublimat      |
| 5. Quecksilberchlorid  | In neutraler Lösung ein weißer, beständiger Niederschlag  | Unter den gleichen Bedingungen gelbweißen, beim Schütteln rötlich werdenden Niederschlag   |
| 6. Silbernitrat  | Weißer Trübung; beim Erhitzen stärker werdend und sich schwärend  | Sofort weißer Niederschlag; beim Schütteln gelb. Auf weiteren Silberzusatz wieder weiß, beim Erhitzen schwarz  |

Um das Arsen in Kakodylsäure und Arrhenal zu mineralisieren, bedient man sich der Schwefelsäure-Salpetersäuremethode und nimmt die Zerstörung im KJELDAHL-Kolben vor. In der Lösung kann man das Arsen in der üblichen Weise nachweisen.

## Nachweis kleinster Arsenmengen.

α) Nach LOCKEMANN. Die Zerstörung der organischen Substanz wird nach LOCKEMANN (S. 1383) vorgenommen. Die MEYERSche Schmelze (zur Trennung von Antimon) wird mit Wasser aufgenommen, filtriert, das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert und die Salpetersäure wie bei der MARSHSchen Methode (S. 1392) durch Abrauchen entfernt. Alsdann fügt man 10 ccm einer reinen, völlig arsenfreien N.-Ferrisulfat- oder Aluminiumsulfatlösung und einen Überschuß von Ammoniak zu. Man erwärmt die Lösung samt Niederschlag etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade, filtriert ab und wäscht den Niederschlag mit verd. Ammoniak aus. Das Filtrat, das noch nach Ammoniak riechen muß, wird mit Schwefelsäure angesäuert, nochmals wie oben mit Aluminium- oder Eisensulfatlösung versetzt und in gleicher Weise mit Ammoniak behandelt. Die vereinigten Niederschläge, die das Arsen enthalten, werden in etwa 20 ccm 10%iger Schwefelsäure gelöst und solange auf dem Wasserbade erwärmt, bis keine Salpetersäure mehr mit Diphenylamin bzw. Brucin, siehe S. 1386, nachweisbar ist. Die Lösung wird alsdann in den Hahntrichter des Apparates (Abb. 16) gebracht.

Der Apparat gleicht dem MARSHSchen Apparat. Der Inhalt des Kolbens *a* beträgt etwa 150 ccm. Das Trockenrohr *b* wird mit etwa haselnußgroßen Stücken krystallisierten Chlorcalciums beschickt. An das Chlorcalciumrohr schließt sich direkt das schwer schmelzbare Arsenrohr an. Die zum Glühen zu erhaltenden Stellen des Rohres werden mit einem Drahtnetz umwickelt und die verjüngte Stelle, wo sich das Arsen niederschlägt, durch eine Kühlvorrichtung, einen Wollfaden, der ständig feucht gehalten wird, abgekühlt. In den Apparat bringt man etwa 15 g verkupfertes Zink, wie bei der Methode nach MARSH (S. 1392), und läßt nun nach Zusatz von etwa 10 ccm Wasser und nach Prüfung der Dichte des Apparates aus dem Hahntrichter zuerst etwa 10 ccm 40% ige Schwefelsäure zufließen. Man verfährt dann weiter, wie bei dem Arsennachweis nach MARSH angegeben ist.

Nach LOCKEMANN kann man noch 0,0001 mg Arsen nachweisen.

Verkleinert man die Apparatur nach MARSH, so können nach BILLETER<sup>1</sup> noch geringere Arsenmengen als nach LOCKEMANN nachgewiesen werden.

β) Nach STRZYZOWSKI<sup>2</sup>. Das Verfahren beruht ebenfalls auf der Methode nach MARSH.

Der Entwicklungsapparat ist durch einen Gummistopfen in einem weithalsigem ERLÉNMEYER-Kolben aufgehängt, der so weit mit kaltem Wasser gefüllt ist, daß der Apparat bis zu seinem Inhalt von diesem umspült wird. Der Apparat besteht aus einem Rohr von etwa 16 cm Länge und 2 cm Durchmesser. Dieses Rohr verjüngt sich unten zu einer Trichterröhre, die nach oben gebogen und eine eingeschliffene Kappe trägt, die in einem Rohr endet, durch das Kohlensäure durch die Apparatur geleitet werden kann. Letzteres

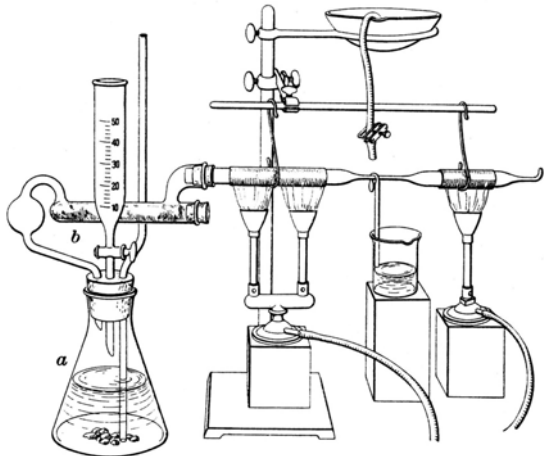


Abb. 16. Apparat zum Nachweis kleinster Arsenmengen. (Nach LOCKEMANN.)

<sup>1</sup> BILLETER: Helv. chim. Acta 1918, 1, 475.

<sup>2</sup> STRZYZOWSKI: Österr. Chem.-Ztg. 1904, Nr. 4.



Rohr selbst trägt wiederum eine eingeschlifene Kappe, die durch ein angeschmolzenes Glasrohr mit einer ganz kleinen Waschflasche durch Gummischlauch verbunden ist, die einige Tropfen konz. Schwefelsäure enthält. An diese Waschflasche schließt sich ein schwer schmelzbares Kaliglasrohr an, dessen Lumen etwa 4 mm beträgt. Dieses Rohr ist in eine sehr enge etwa 4 cm lange Capillare ausgezogen, deren Lumen etwa 0,1 mm beträgt. Unter dem nicht verjüngten Teil des Rohres befindet sich eine Bunsenflamme, die durch einen Schornstein geschützt ist. Über dem Rohr an der Glühstelle ist ein Porzellandeckel, der den Abfluß der Wärme der Bunsenflamme verringern soll, angebracht. Das Ende des Rohres steht durch Gummischlauch mit einer Waschflasche von 50 ccm Inhalt in Verbindung, die ihrerseits mit einer Saugpumpe verbunden ist und eine 3%ige Silbernitratlösung enthält.

In das Entwicklungsrohr bringt man 10 g arsenfreies, reinstes Stangen-zink, das in kleine Stückchen zerteilt ist. Durch die Apparatur leitet man mit Wasser und Schwefelsäure gewaschene Kohlensäure, bis alle Luft aus dem Apparat verdrängt ist, was in etwa 1 Minute erreicht wird. Alsdann zündet man unter dem Kalirohr die Bunsenflamme an und bringt in das Trichterrohr einen Tropfen Platinchloridlösung (1:1000) und etwa 10 ccm einer Mischung, bestehend aus 50% iger Schwefelsäure und der zu untersuchenden wäßrigen oder nur gering schwefelsäurehaltigen Flüssigkeit, deren Gehalt an Schwefelsäure 15% nicht überschreitet. Man schließt die Kappe und setzt nun die Saugpumpe langsam in Tätigkeit, und zwar so, daß in dem Trichterrohr die Flüssigkeit stets etwas niedriger steht als in dem Entwicklungsgefäß. Nach etwa 30 Minuten wird der Rest, etwa 10 ccm, zugegeben. Hat sich in der Capillare des Kalirohres nach etwa 2 Stunden kein bräunlicher Anflug gebildet — den man leichter feststellen kann, wenn man hinter der Capillare einen glänzenden Porzellandeckel anbringt —, so ist die Substanz arsenfrei. Zu bemerken ist, daß diese Methode nur beim Nachweis kleinster Arsenmengen Anwendung findet; sie ist namentlich geeignet, die Chemikalien auf Arsenfreiheit zu prüfen.

Nach STRYZOWSKI soll man noch 0,0001 mg Arsenige Säure ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) nachweisen können.

$\gamma$ ) Colorimetrischer Nachweis nach BECK und MERRES<sup>1</sup>. Dieses Verfahren beruht darauf, daß der aus Zink und Schwefelsäure sich entwickelnde Wasserstoff, der das Arsen als Arsenwasserstoff mit sich reißt, auf einen Papierstreifen einwirkt, der mit alkoholischer Quecksilberbromidlösung getränkt ist. Der Arsenwasserstoff färbt das Quecksilberbromid, je nach der Menge des vorhandenen Arsens, gelb bis braunrot. Näheres siehe unter quantitativer Bestimmung des Arsens nach BECK und MERRES (S. 1403).

### c) Bestimmung des Arsens.

#### $\alpha$ ) Gewichtsanalytische Bestimmung.

1. Bei der gewichtsanalytischen Methode wird das in Arsensäure übergeführte Arsen mit Magnesiamixtur als Ammonium-Magnesium-pyroarsenat ( $\text{AsO}_4(\text{NH}_4)\text{Mg} + 6 \text{H}_2\text{O}$ ) gefällt. Da nun die in allen Organen vorhandene Phosphorsäure zusammen mit der Arsensäure niedergeschlagen wird, so müssen beide zuvor voneinander getrennt werden, indem man entweder das Arsen durch Schwefelwasserstoff ausscheidet oder mit Salzsäure und Eisenchlorürlösung nach SCHNEIDER-FYFE-BECKURTS<sup>2</sup> als Arsenrichlorid ( $\text{AsCl}_3$ ) überdestilliert. In beiden Fällen wird nach der Oxydation zu Arsensäure dasselbe als Ammonium-Magnesiumarsenat gefällt und dieses nach dem Sammeln und Auswaschen im Filtertiegel durch Glühen in Magnesiumpyroarsenat überführt und zur

<sup>1</sup> BECK u. MERRES: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1917, 50, 38.

<sup>2</sup> SCHNEIDER, FYFE, BECKURTS: Arch. Pharm. 1884, 222, 653.

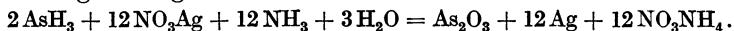
Wägung gebracht. Die gewichtsanalytisch gefundene Menge, mit 0,6373 multipliziert, ergibt den Gehalt an Arseniger Säure ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ).

2. Man kann auch den nach MARSH erhaltenen Arsenspiegel auf der Mikrowaage wägen. Zu diesem Zweck schneidet man das Rohr ober- und unterhalb des Arsenspiegels ab, wägt es, löst alsdann den Arsenspiegel in konz. Salpetersäure, wäscht das Rohr aus, trocknet es und wägt es zurück. Die Differenz gibt das Arsen an. Multipliziert man den gefundenen Wert mit 1,32, so erhält man den Gehalt an Arseniger Säure ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ).

3. Nach SMITH bzw. BECK und MERRES<sup>1</sup> wird der aus der dreiwertigen Arsenverbindung durch naszierenden Wasserstoff in einem kleinen Kölbchen von etwa 150 ccm erzeugte Arsenwasserstoff durch ein Kugelrohr nach MAI und HURT (S. 1402) geleitet, das eine 5%ige Quecksilberchloridlösung enthält. Liegt fünfwertiges Arsen vor, so tut man gut, dieses durch Schweflige Säure, die durch Kochen wieder entfernt werden muß, oder durch Zusatz von etwas reinem Jodkalium zu reduzieren. Eine entstandene Jodausscheidung bzw. durch freies Jod erzeugte Braunfärbung muß durch einige Tropfen Zinnchlorürlösung weggenommen werden. Der Arsenwasserstoff verbindet sich mit dem Quecksilberchlorid zu einem gelben Niederschlag, der aus  $\text{AsH}(\text{HgCl})_2$  und auch aus  $\text{As}(\text{HgCl})_3$  bestehen kann. Wird nach beendeter Einwirkung der Inhalt der Kugelhöhle nebst Niederschlag erhitzt, so tritt eine Umsetzung in der Weise ein, daß sich Quecksilberchlorür ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) und Arsenige Säure bilden; dieser Niederschlag wird, je nach der Menge, in einem Filtertiegel oder Mikrofilterröhrchen gesammelt, ausgewaschen und nach dem Trocknen bei  $105^\circ$  zur Wägung gebracht. 0,1 g Quecksilberchlorür = 0,00701 g Arsenige Säure ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ).

### β) Maßanalytische Bestimmung.

αα) Diese Methoden beruhen darauf, daß Arsen aus seiner dreiwertigen Verbindungsform in Arsenwasserstoff übergeführt wird, der, in eine 0,01—0,02 N.-Silbernitratlösung eingeleitet, metallisches Silber ausscheidet. Der Silberverbrauch wird durch Titration mit Rhodanammoniumlösung zurückgemessen. Die Umsetzung ist folgende:



Es ist ratsam, die Silberlösung mit etwas Ammoniak zu versetzen, da sonst die frei werdende Salpetersäure ausgeschiedenes Silber wieder auflöst. Am besten verfährt man, wie bei der gewichtsanalytischen Arsenbestimmung 3) nach SMITH bzw. BECK und MERRES beschrieben wurde. Lag fünfwertiges Arsen vor, so wird die Reduktion des Arsens vorgenommen, wie dort auch ausgeführt wurde. Nun leitet man den sich entwickelnden Arsenwasserstoff durch ammoniakalische, gemessene 0,05 oder 0,01 N.-Silbernitratlösung. Über die Ausführung der Titration und die Berechnung siehe unter Bestimmung des Arsens nach MAI und HURT und auch unter γγ), S. 1402.

Man kann auch nach NEY<sup>2</sup> im Ölbad die Substanz, 100 g, mit 100 ccm konz. Salzsäure, D. 1,19, 2 g Bromkali und 5 g Hydrazinsulfat bis zur Sirupdicke überdestillieren und in 200 ccm Wasser auffangen. Mittels 0,1 oder 0,01 N.-Jodlösung läßt sich das Arsen titrimetrisch bestimmen. Die Lösung muß vorher mit Natriumbicarbonat in geringem Überschuß versetzt werden. 1 ccm 0,1 N.-Jodlösung = 0,004946 g  $\text{As}_2\text{O}_3$ .

ββ) Durch Reduktion des durch Zerstören der organischen Substanz nach LOCKEMANN oder DENIGÈS in Arsensäure übergeführten Arsens zu Arseniger Säure mittels Schwefliger Säure s. oben unter 3 und Zerlegung der Arsenigen

<sup>1</sup> BECK und MERRES: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1917, 50, 38.

<sup>2</sup> Ney: Pharm. Ztg. 1911, 56, 615.

Säure durch den elektrischen Strom in Arsenwasserstoff, der in ammoniakalische Silberlösung eingeleitet wird. Die Zersetzung kann in dem von C. MAI und H. HURT<sup>1</sup> oder H. FRERICHS und G. RODENBERG<sup>2</sup> beschriebenen Apparat vorgenommen werden.

Beim Apparat von MAI und HURT<sup>1</sup> (Abb. 17) wird das U-Rohr *A* bis zu  $\frac{2}{3}$  durch ein Trichterrohr *c* mit 12%iger Schwefelsäure gefüllt und ein Strom von 6—8 Volt und 2—3 Amp. durchgeleitet. Die Elektrodenplatten *a* und *b* bestehen aus Blei. Das sich entwickelnde Gas wird durch ein kleines Rohr *d* geleitet, das Bimssteinstückchen enthält, die mit alkalischer Bleilösung getränkt sind. An dieses Rohr schließt sich ein Kugelrohr *B* an, das ammoniakalische 0,01 N.-Silbernitratlösung in abgemessener Menge enthält. Der positive Pol wird mit der Bleiplatte *a* des einen Schenkels, der negative Pol *b* mit der Bleiplatte des andern Schenkels des Glasgefäßes verbunden, in welchem sich auch das Hahntrichterrohr *c* befindet, dessen Abflußrohr etwa 2 cm

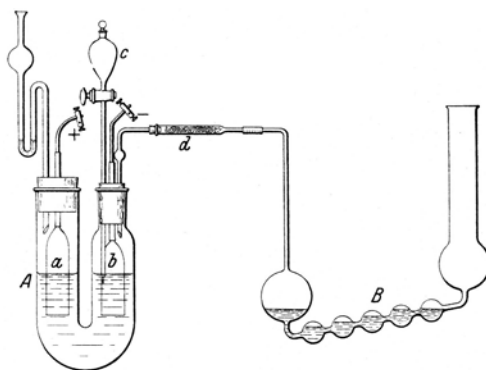


Abb. 17. Apparat zur Bestimmung von Arsen.  
(Nach MAI und HURT.)

tief in die Schwefelsäure eintaucht. Die zu prüfende Flüssigkeitsmenge darf 10 ccm nicht überschreiten. Erst nachdem im Apparat über 1 Stunde Wasserstoff entwickelt worden ist und sich in dem Kugelrohr kein brauner Belag von ausgeschiedenem Silber gebildet hat, mithin die Schwefelsäure und das Kathodenblei absolut arsenfrei sind, läßt man ganz langsam die zu prüfende Flüssigkeit aus dem Hahntrichter zuträufeln. Der Hahntrichter wird mit etwas Wasser nachgewaschen. Nach 3 Stunden ist die Überführung in Arsenwasserstoff

vollendet. Der Inhalt der Kugelröhre wird durch ein Asbeströhrchen filtriert und der Überschuß an Silbernitrat in salpetersaurer Lösung mit 0,01 N.-Rhodanlösung nach VOLHARD zurückgemessen. Als Indicator dient Ferriammonsulfatlösung. Um den Umschlag scharf zu erkennen, nimmt man die Titration in einem kleinen Glasstöpselgefäß vor und setzt vor der Titration soviel reinen Äther zu, daß derselbe eine etwa  $\frac{1}{2}$  cm hohe Schicht ausmacht. Sobald sich Rhodansilber bei der Titration ausscheidet, schüttelt man kräftig um. Das Rhodan- und Halogensilber setzt sich in der Ätherschicht ab, so daß der wäßrige untere Teil klar wird und das Ende der Titration sich scharf erkennen läßt. Bei Anwendung von 0,01 N.-Silbernitratlösung zeigt 1 ccm verbrauchter Silberlösung = 0,165 mg Arsenige Säure ( $As_2O_3$ ) an. Die Methode gibt bei Mengen von 0,1—20 mg Arseniger Säure gute Resultate. Empfehlenswert ist es, das Schenkelrohr durch ein Tondiaphragma in zwei Zellen zu zerlegen, wie es auch bei der Apparatur von FRERICHS und RODENBERG<sup>3</sup> der Fall ist; näheres hierüber berichten auch QUINCKE und SCHMETTKA<sup>4</sup>.

γγ) Im MARSHSchen Apparat wird Wasserstoff entwickelt und dieser genau, wie oben bei MAI und HURT beschrieben, durch ein kleines Rohr, das mit Bimssteinstückchen gefüllt und mit alkalischer Bleiacetatlösung getränkt ist, durch ein oder zwei Kugelrohre geleitet, die gemessene ammoniakalische

<sup>1</sup> C. MAI u. H. HURT: Z. 1905, 9, 193.

<sup>2</sup> H. FRERICHS u. G. RODENBERG: Arch. Pharm. 1905, 243, 348.

<sup>3</sup> FRERICHS u. RODENBERGER: Arch. Pharm. 1905, 243, 348.

<sup>4</sup> QUINCKE u. SCHMETTKA: Z. 1933, 66, 581.

Silberlösung enthalten (Abb. 18). Ist nach Verlauf von 1 Stunde keine Dunkel-färbung der Kugelhöhre durch ausgeschiedenes Silber, namentlich dort, wo der etwa vorhandene Arsenwasserstoff zuerst mit der Silberlösung in Berührung kommt, entstanden, so ist das Zink und die Schwefelsäure rein. Es ist ratsam, einige Zinkstückchen, wie beim Arsennachweis nach MARSH (S. 1392) ange-geben, zu verkupfern, damit die Wasserstoffentwicklung nicht zu träge ist. Alsdann fügt man nach und nach die zerstörte arsenhaltige, schwefelsaure Lösung zu. Man reduziert auch hier zuvor das fünfwertige Arsen durch Schweflige Säure, die durch Erhitzen der Lösung wieder völlig zu vertreiben ist, oder durch Zusatz von Jodkalium und Wegnahme des Jods mit einigen Tropfen Zinnchlorürlösung. Nach 3 Stunden ist bei nicht zu großen Mengen

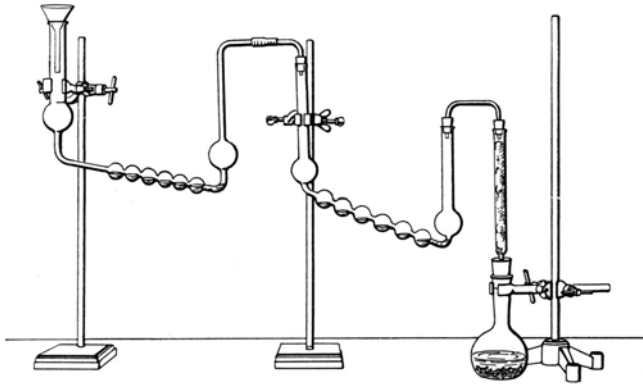


Abb. 18. Apparat zur titrimetrischen Bestimmung von Arsen.

die Reaktion beendet. Die Titration der vorgelegten 0,01 N.-Silberlösung wird nach VOLHARD, wie bei dem Verfahren von MAI und HURT (S. 1402) beschrieben, ausgeführt.

### γ) Colorimetrische Bestimmung.

Diese Methode beruht darauf, daß man Arsen in Arsenwasserstoff überführt und diesen über einen Papierstreifen leitet, der mit Quecksilberchlorid oder -bromidlösung getränkt ist. Je nach der Menge des vorhandenen Arsenwasserstoffs tritt eine gelbe bis braune Färbung des Papierstreifens ein. Durch Vergleich mit Papierstreifen, über die eine bestimmte größere oder kleinere Menge Arsenwasserstoff bzw. zu Arsenwasserstoff reduzierte Arsenige Säure geleitet wurde, kann man den Arsengehalt schätzen. Diese Methode wurde von HEFTI und THORPE<sup>1</sup> angewendet, die jetzt gebräuchlichste Methode ist die von BECK und MERRES, die bei kleinsten Arsenmengen, bis zu 0,07 mg Arsenige Säure, anwendbar ist.

Methode von BECK und MERRES<sup>2</sup>. Die Zerstörung der organischen Substanz erfolgt nach einer der bekanntesten Methoden (LOCKEMANN, DENIGES usw.), bei welchen das Arsen in fünfwertiger Form vorliegt. Man neutralisiert die nicht zu stark saure Lösung mit Ammoniak und fügt soviel Ammoniak zu, daß eine etwa 2,5%ige ammoniakalische Flüssigkeit entsteht. Zu dieser gibt man alsdann 10 ccm einer 10%igen Natriumphosphatlösung und 100 ccm Magnesiamixtur. Der entstandene Niederschlag von Ammonium-Magnesiumphosphat reißt auch Spuren von Ammonium-Magnesiumarsenat völlig aus der Lösung mit nieder.

<sup>1</sup> TREADWELL: Lehrbuch der analytischen Chemie.

<sup>2</sup> BECK u. MERRES: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1917, 50, 38.

Nachdem man den Niederschlag am besten 12 Stunden hat stehen lassen, filtriert man ab. Der gesammelte und mit ammoniakalischem Wasser ausgewaschene Niederschlag wird feucht noch in chemisch reiner verd. Salzsäure oder Schwefelsäure gelöst und zur Reduktion der Arsensäure zur Arsenigen Säure Jodkalium zugegeben. Das ausgeschiedene Jod wird durch 4—5 Tropfen 40%iger Zinnchlorürlösung gebunden.

Die so vorbereitete Lösung oder einen aliquoten Teil davon bringt man zur Bestimmung des Arsens in ein starkwandiges Gefäß von etwa 150—200 ccm

Fassungsvermögen, das mit einem durchbohrten Gummistopfen versehen ist. In der Bohrung befindet sich, wie die Abb. 19 zeigt, ein nach unten verjüngtes Glasröhrchen von etwa 15 cm Länge und 1—1,25 cm lichter Weite.

Auf dieses Röhrchen ist mit Gummistopfen ein gleiches Röhrchen aufgesetzt, an welches sich endlich ein Glasröhrchen von 15 cm Länge und 3 mm lichter Weite anschließt. Das unterste Röhrchen ist mit Filtrierpapierstreifen, das darauf folgende mit Baumwollfäden gefüllt, die beide mit 5%iger Bleiacetatlösung getränkt sind. In das oberste, dünne Röhrchen wird ein in der Breite genau passender Zeichenpapierstreifen von 20 cm Länge gebracht, der in folgender Weise präpariert ist: Man legt die Papierstreifen 1 Stunde lang in eine alkoholische 5%ige Quecksilberbromidlösung, zieht sie dann durch zwei schwach zusammengepreßte Finger, damit die überschüssige Quecksilberbromidlösung entfernt wird und trocknet sie bei Lichtabschluß. Die Streifen sind längere Zeit im Dunkeln, in einem verschlossenen Röhrchen aufbewahrt, haltbar.

In das Entwicklungsgefäß gibt man nun etwa 100 ccm von der Säure, die zur Lösung der Ammonium-Magnesium-Verbindungen benutzt wurde (10%ige Salzsäure oder Schwefelsäure) und fügt 15 g Stangenzink in zwei Stücken zu. Der sich entwickelnde Wasserstoff streicht durch die mit Bleiacetatpapier bzw. Wollfäden gefüllten beiden Röhrchen an dem Quecksilberbromidpapier vorbei und färbt dieses bei Anwesenheit von Arsen mehr oder weniger stark gelb bis

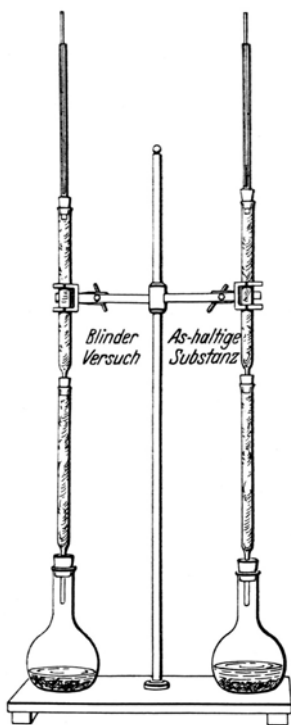


Abb. 19. Apparat zur colorimetrischen Arsenbestimmung.  
(Nach BECK und MERRES.)

braunrot. Durch Vergleich mit der Farbenstärke von Papierstreifen, die man in gleicher Weise mit steigenden Mengen Arseniger Säure, z. B. 0,002, 0,005, 0,01, 0,02 und 0,04 mg, hergestellt hat, ermittelt man den Arsengehalt der verwendeten Lösung. Bei größeren Mengen als 0,04 mg Arsenige Säure ( $As_2O_3$ ) wird die Färbung des Streifens zu stark, so daß ein colorimetrischer Vergleich nicht gut mehr möglich ist. Für eine regelmäßige Wasserstoffentwicklung ist, nötigenfalls durch Einstellen des Entwicklungsgefäßes in Eiswasser, Sorge zu tragen. Nach etwa 1—2 Stunden ist die Reaktion beendet und das Arsen als Arsenwasserstoff übergetrieben.

Zuvor prüft man die Apparatur und die verwendeten Reagenzien, Zink und Säure, mit demselben Apparat in ganz derselben Weise auf ihre Reinheit. Macht sich nach Verlauf einer Stunde bei regelmäßiger Wasserstoffentwicklung in dem unteren Teil des Papierstreifens keine Gelbfärbung bemerkbar, so sind die Reagenzien rein. Ein minimaler gelber Hauch an dem Quecksilberbromidpapierstreifen ist belanglos, da diese minimalsten Spuren Arsen nicht ins Gewicht fallen.

Man entleert alsdann den Apparat und füllt ihn für den eigentlichen Versuch von neuem in der oben angegebenen Weise.

Man kann auch die abgeänderte Apparatur nach SCHROEDER u. LÜHR<sup>1</sup> benutzen, die das Quecksilberbromidpapier aufrollen.

POLJAKOW u. KOLOKOW<sup>2</sup> bestimmen den Grad der Blaufärbung, den eine Arsensäurelösung in einer Ammoniummolybdatlösung hervorruft.

#### δ) Nephelometrische Bestimmung.

Leichteile und sonstige organische Substanzen enthaltende Objekte können nach bekannten Methoden zerstört werden. Am besten ist die Zerstörung mit Schwefelsäure und Salpetersäure. Das Arsen wird in Arsenrichlorid übergeführt und abdestilliert. Das überdestillierte Arsen wird vermittels konz. Wasserstoffsperoxydlösung in schwach natronalkalischer Lösung zu Arsensäure oxydiert, und die Lösung alsdann eingedampft. Nach Zusatz von Phenolphthalein als Indicator wird die Lösung mit Salzsäure ganz schwach angesäuert und kurze Zeit auf dem Wasserbade angewärmt. Tritt eine Rosafärbung auf, so fügt man noch einige Tropfen Salzsäure zu. Ist die Lösung trübe, so filtriert man sie durch Glasfilter von SCHOTT und füllt auf ein bestimmtes Volumen auf. Zu einem aliquoten Teil fügt man in einer Flasche mit Glasstopfen das Trübungsreagens zu. Dieses besteht aus einer Lösung von Kaliummolybdat, Salzsäure und Cocainhydrochloridlösung. Zum Vergleich im Nephelometer benutzt man Lösungen mit bestimmtem Arsensäuregehalt. Näheres siehe in der Literatur<sup>3</sup>.

#### ε) Nachweis von Arsen in Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen.

Die organische Substanz der Lebensmittel wird nach der einen oder anderen der beschriebenen Methoden zerstört und nach MARSH auf Arsen geprüft. In besonderen Fällen, z. B. bei der Feststellung von arsenhaltigen Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Früchten, Äpfeln usw., kann man nach LENDRICH und MAYER<sup>4</sup> in der Weise verfahren, daß man die Früchte 2 Stunden lang unter häufiger Bewegung bei 40—50° in 5%iger Salpetersäure liegen läßt. Die abgegossene Lösung wird dann eingedampft, mit konz. Schwefelsäure versetzt und nach dem Zerstören der gelösten organischen Substanz und Verjagen der Salpetersäure auf Arsen geprüft.

Auch nach der Methode nach STRZYZOWSKI kann die Zerstörung von Lebensmitteln in folgender Weise vorgenommen werden: In einen etwa 25 ccm fassenden Porzellantiegel bringt man 1 g Magnesiumoxyd und 5—10 g halbflüssiges Untersuchungsmaterial, dem man noch 10 ccm Wasser zufügt, und setzt diesem Gemisch 0,5—1 ccm konz. Salpetersäure zu. Nachdem die Masse auf dem Wasserbade eingetrocknet ist, wird der Tiegel auf freier Flamme langsam stärker und schließlich solange erhitzt, bis die Masse weiß geworden ist. Eine Zerkleinerung des Materials ist hierbei unter Umständen notwendig. Den Rückstand nimmt man mit 10 ccm Wasser auf und setzt 5,5 ccm 50%ige Schwefelsäure zu. Das Ganze wird, wenn notwendig, filtriert und mit 12,5%iger Schwefelsäure nachgewaschen, so daß insgesamt 20—25 ccm Filtrat entstehen, die nach MARSH auf Arsen geprüft werden. Die Chemikalien sind selbstverständlich durch einen Leerversuch auf Arsenfreiheit zu prüfen.

Arsenwasserstoff. Um Arsenwasserstoff in Luft nachzuweisen, leitet man eine gemessene Menge Luft durch Silbernitratlösung und weist die nun vorhandene arsenige

<sup>1</sup> SCHROEDER u. LÜHR: Z. 1933, 65, 168.

<sup>2</sup> POLJAKOW u. KOLOKOW: Biochem. Zeitschr. 1929, 213, 375; Z. 1934, 67, 457.

<sup>3</sup> Biochem. Zeitschr. 1927, 185, 14, 44 u. Deutsch. Zeitschr. gerichtl. Med. 1927, 11, 61.

<sup>4</sup> LENDRICH u. MAYER: Z. 1927, 54, 137.

Säure nach Ausfällung des überschüssigen Silbers mit Salzsäure im Filtrat nach (s. S. 1392). Die Luft muß vorher von Schwefelwasserstoff befreit werden. H. LOCKEMANN<sup>1</sup> absorbiert die gasförmigen Arsenverbindungen durch Kohlepulver und weist alsdann in derselben das Arsen nach.

## 2. Antimon.

Vergiftungen können hervorgerufen werden durch verstäubtes metallisches Antimon sowie durch Antimonoxyd,  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ , infolge seiner leichten Löslichkeit im Organismus. Von Wichtigkeit wegen ihrer giftigen Wirkung sind ferner die in der Technik und der Arzneykunde angewandten, in Wasser löslichen Antimonverbindungen, wie der Brechweinstein, Fluordoppelsalze, Bleiantimoniat usw. (s. Band I, S. 1096).

Antimonwasserstoff ( $\text{SbH}_3$ ) wirkt ähnlich wie Arsenwasserstoff.

Antimonhalogenverbindungen, wie Antimontrichlorid, Antimonpentachlorid u. a. haben eine untergeordnete Bedeutung; es kommt ihnen eine starke Ätzwirkung infolge Abspaltung von Salzsäure zu.

Organische Antimonverbindungen finden, ebenso wie organische Arsenverbindungen, auch in Verbindung mit diesen medizinische Anwendung.

Antimon ist wie Arsen nach Jahren in Leichenteilen noch nachweisbar. Zur Sicherheit ist es ratsam, bei exhumierten Leichen Bestandteile des Sarges, Hobelspäne, Leintücher, gefärbte Stoffe usw. zu entnehmen, damit diese gegebenenfalls auf Antimon geprüft werden können; siehe bei Arsen S. 1395.

**a) Nachweis.**  $\alpha$ ) Prüfung nach REINSCH: Sie ist wie bei Arsen (S. 1391) beschrieben auszuführen. Es schlägt sich auf Kupfer ein schwärzlicher Beschlag nieder. Bringt man das Kupferblech in ein Glühröhrchen und glüht, so bildet sich kein Beschlag von oktaedrischen Krystallen wie bei Arsen.

$\beta$ ) Prüfung nach MARSH. In der schwer schmelzbaren Röhre bildet sich ein nicht glänzender, schwarzer Spiegel, dessen Eigenschaften bei Arsen (S. 1394) beschrieben sind.

$\gamma$ ) Im Gang der Analyse (S. 1386) wird das durch die Schmelze mit Cyankalium in Metall übergeführte Antimon in Königswasser gelöst und die Lösung zur Trockene verdampft. Leitet man in die Lösung des in wenig verd. Salzsäure gelösten Rückstandes Schwefelwasserstoff ein, so scheidet sich orangerotes Antimonpentasulfid ( $\text{Sb}_2\text{S}_5$ ) ab, das in gelbem Schwefelammonium löslich ist.

$\delta$ ) Zink und Zinn fallen aus der schwach salzsauren Lösung von Antimon metallisches Antimon aus.

**b) Bestimmung.** Die Bestimmung erfolgt durch Fällen des Antimons mit Schwefelwasserstoff. Da meist eine Zerstörung organischer Substanzen vorangegangen ist und nach der Trennung von etwa vorhandenem Arsen durch die MEYERSCHE Schmelze das Antimon durch die reduzierende Cyankaliumschmelze als Metall abgeschieden und vermittels Königswasser in Lösung übergeführt wird, so liegt das Antimon in fünfwertiger Verbindungsform vor. Das durch Schwefelwasserstoff in der erwärmten Lösung ausgefällte Antimonpentasulfid wird auf einem gewogenen Filter gesammelt, mit warmem, schwefelwasserstoffhaltigem Wasser, dann nacheinander mit Alkohol, Schwefelkohlenstoff und wieder Alkohol und zuletzt mit Äther ausgewaschen und nach dem Trocknen als Antimonpentasulfid zur Wägung gebracht. Man kann auch den Antimon-sulfidniederschlag nach dem Auswaschen in Schwefelammonium lösen und in einem gewogenen Tiegel zur Trockene verdampfen. Den Tiegel setzt man dann unter eine Glasglocke, unter der sich ein kleines Schälchen mit rauchender

<sup>1</sup> LOCKEMANN: Zeitschr. analyt. Chem. 1926, **39**, 1125.

Salpetersäure befindet. Ist der Tiegelinhalt weiß geworden, so raucht man die Schwefelsäure mit aufgelegtem Deckel ab; leichter läßt diese sich entfernen, wenn man mehrmals etwas Ammoniumnitrat zugibt. Alsdann glüht man den Rückstand im offenen Tiegel bis zur Gewichtskonstanz. Der Rückstand enthält Antimontetroxyd,  $\text{Sb}_2\text{O}_4$ , was bei der Berechnung zugrunde zu legen ist.

Antimonwasserstoff kann, wie bei Arsenwasserstoff angegeben, aufgefangen und alsdann nachgewiesen werden, siehe hierzu SCHOORL, S. 1389.

### 3. Zinn.

Von Wichtigkeit in toxikologischer Hinsicht sind nur die in der Färberei zur Anwendung gelangenden Salze, das Zinnchlorür ( $\text{SnCl}_2$ ) und die Doppelsalze des Zinns, z. B. Pinksalz ( $\text{SnCl}_4(\text{NH}_4\text{Cl})_2$ ) (s. Band I, S. 1082).

Nach WIRTHLE<sup>1</sup> und auch DEUSSEN<sup>2</sup> wird in organischen Verbindungen durch Zerstören der organischen Substanz mit Salzsäure und Kaliumchlorat nicht alles Zinn in Lösung übergeführt. Es ist in solchen Fällen ratsam, den nicht zerstörten Rest mit konz. Schwefelsäure zu zersetzen und den zerriebenen kohligen Rückstand mit Natriumcarbonat und Salpeter zu schmelzen. Die Schmelze wird mit Wasser aufgeweicht, Kohlensäure eingeleitet und filtriert. Der Filtrerrückstand wird mit Cyankalium in bedecktem Tiegel geschmolzen, die ausgeschiedenen Zinnkügelchen werden in warmer, verd. Salzsäure gelöst und zum Nachweis benutzt.

a) **Nachweis.** 1. Schwefelwasserstoff fällt braunschwarzes Zinnsulfür ( $\text{SnS}$ ), das unlöslich in Ammoniumcarbonat und farblosem Schwefelammonium ist; in gelbem Schwefelammonium löst es sich als Sulfosalz auf.

2. Dampft man die salzsaure Zinnlösung mit konz. Salpetersäure ein, so entsteht weiße Zinnsäure ( $\text{Sn}(\text{OH})_4$ ).

3. Fügt man zu der salzsauren Lösung Quecksilberchloridlösung, so bildet sich ein weißer Niederschlag von Quecksilberchlorür, der bei überschüssiger Zinnlösung unter Abscheidung von Quecksilber schwarz wird.

4. Einige Tropfen Goldchloridlösung der Zinnchlorürlösung zugesetzt, rufen eine braune bis violette Färbung hervor, die man in einer weißen Porzellschale gut beobachten kann,  $\text{CASSIUS-Goldpurpur}$  ( $3 \text{SnCl}_2 + 2 \text{AuCl}_3 = 2 \text{Au} + 3 \text{SnCl}_4$ ).

b) **Bestimmung.** Bestimmung als Zinndioxyd ( $\text{SnO}_2$ ). Das Zinn wird durch Schwefelwasserstoff gefällt und die Fällung solange stehen gelassen, bis der Geruch nach Schwefelwasserstoff verschwunden ist. Den Niederschlag sammelt man auf einem Filter, wäscht ihn mit verd. Ammoniumnitratlösung aus, verkohlt das Filter in einem Porzellantiegel, und glüht den Rückstand mit aufgelegtem Tiegeldruck einige Zeit. Dann läßt man erkalten, setzt ein kleines Stückchen Ammoniumcarbonat zu und erhitzt den Tiegel zuerst gelinde, später zum Glühen. Diese letzte Behandlung wird nach erfolgter Wägung wiederholt, damit man sicher ist, daß keine Schwefelsäure im Tiegel zurückgeblieben ist.

Auch durch Elektrolyse kann Zinn bestimmt werden.

Um kleine Mengen Zinn, die bei der Zerstörung von Leichenteilen durch Absorption an den unzerstörten Anteilen haften, zu erfassen, ist es ratsam, die Zerstörung mit Schwefelsäure und nachfolgendem Zusatz von Perhydrol durchzuführen<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> WIRTHLE: Chem.-Ztg. 1900, 24, 263.

<sup>2</sup> DEUSSEN: Arch. Pharm. 1926, 264, 360.

<sup>3</sup> Pharm. Zentralh. 1927, 68, 161.



#### 4. Selen.

Ähnliche Wirkung wie Arsen übt auch Selen aus (s. Band I, S. 1098). In Glashütten findet Natriumselenit Verwendung<sup>1</sup>. Salzsaurer Lösungen von Selen dürfen wegen Verflüchtigung des Selen nicht eingedampft werden. Nach Zerstörung der organischen Substanz mit Salzsäure und Kaliumchlorat am Rückflußkühler kann Selen, das jetzt als Selensäure vorliegt, als Schwefelselen durch Schwefelwasserstoff gefällt werden. Der auf dem Filter gesammelte und ausgewaschene Niederschlag wird durch rauchende Salpetersäure in Selensäure übergeführt und die überschüssige Salpetersäure auf dem Wasserbade abgedampft. Der Rückstand wird in Schwefelsäure gelöst und zur Entfernung der Salpetersäure bis zur Entwicklung weißer Dämpfe über der Flamme erhitzt. Diese selenhaltige Schwefelsäure dient nach dem Verdünnen mit Wasser zum Nachweis des Selen. Da Selen und Arsen häufiger zusammen vorkommen, so kann man den Schwefelwasserstoffniederschlag mit Ammoniumcarbonatlösung ausziehen, die Arsen in Lösung überführt, während Schwefelselen auf dem Filter zurückbleibt.

**a) Nachweis.**  $\alpha$ ) REINSCHEsche Probe: Über die Ausführung siehe S. 1391. Es bildet sich auf dem Kupferblech ein schwarzer Überzug. Bringt man das Kupferblech in ein Glührohr, so kann man durch Überleiten von getrocknetem Sauerstoff und Erhitzen des Kupfers das Selen in Selendioxyd überführen, das ein Sublimat von prismatischen Krystallen liefert, die leicht zerfließen.

$\beta$ ) GUTZEITSche Probe. Über die Ausführung siehe bei Arsen S. 1391. Es entsteht ein gelber Flecken.

$\gamma$ ) Zinnchlorür-Lösung gibt einen roten Niederschlag, kleine Mengen Selen geben erst nach längerer Zeit eine braune Färbung.

**b) Bestimmung.** Das durch Schwefelwasserstoff gefällte Selen wird auf einem Filter gesammelt und der Niederschlag nebst Filter in ein Kölbchen mit Rückflußkühler gebracht und mit rauchender Salpetersäure versetzt. Nachdem die Haupteinwirkung stattgefunden hat, wird erwärmt und nach erfolgter Auflösung auf ein bestimmtes Volum gebracht. Ein aliquoter Teil wird mit Ammoniak neutralisiert, mit verd. Salzsäure schwach angesäuert, und das Selen in der Wärme mit Hydrazinsulfat gefällt, gesammelt, getrocknet und gewogen.

#### 5. Tellur.

Vergiftungen mit Tellur sind noch nicht beobachtet worden. Tellurwasserstoff soll starke Giftwirkung zeigen. Der Tellurwasserstoff wird ebenso wie Selenwasserstoff von Bleiacetatlösung gebunden, im Gegensatz zum Arsenwasserstoff.

#### 6. Quecksilber.

Das metallische Quecksilber kann durch Einatmen von Quecksilberdampf in den Organismus gelangen. Auch aus Zahnamalgamplomben verflüchtigt sich nach STÖCK<sup>1</sup> Quecksilber und teilt sich dem Organismus mit. Alle in Wasser und verd. Säuren löslichen Verbindungen des Quecksilbers spielen in der forensen Chemie eine Rolle, wie Quecksilberchlorid (Sublimat), Quecksilberjodid, Quecksilbercyanid, Quecksilberrhodanid usw. Auch organische Quecksilberverbindungen, die in der Medizin Anwendung finden, können zu Vergiftungen führen. Ungiftig ist das natürlich vorkommende Quecksilbersulfid (Zinnober); geringere Giftigkeit besitzt Quecksilberchlorür (Kalomel). Ein Teil des Quecksilbers wird durch den Harn ausgeschieden (s. Band I, S. 1077).

<sup>1</sup> Z. 1927, 53, 264.

### a) Zerstörung der organischen Substanz.

Wegen der Flüchtigkeit des Quecksilbers muß die Zerstörung der organischen Substanz am Rückflußkühler vorgenommen werden. Am besten eignet sich dazu die Methode von FRESSENIUS und v. BABO mit Salzsäure und Kaliumchlorat, die S. 1381 näher beschrieben ist. Minimale Spuren Quecksilber bleiben in den nicht zerstörten Anteilen zurück. Das überschüssige Chlor ist durch einen langsamen Strom von Kohlensäure zu entfernen. Alsdann leitet man in die schwach saure Lösung Schwefelwasserstoff bei etwa 50° ein und läßt die Fällung über Nacht absitzen. Der auf dem Filter gesammelte Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoffwasser ausgewaschen und nach Zusatz von Salzsäure durch Einleiten von Chlor oder durch Salzsäure und wenig Kaliumchlorat bei gelinder Wärme in Lösung gebracht; das überschüssige Chlor wird durch Kohlensäure vertrieben. Die schwach salzsaure, wäßrige Lösung dient zum Nachweis des Quecksilbers.

### b) Nachweis.

1. Bringt man 1 Tropfen der Lösung auf ein blankes Kupferblech, so scheidet sich Quecksilber ab. Wird die Stelle mit einem Tuch poliert, so tritt ein silberglänzender Fleck auf, der beim Erhitzen verschwindet.

2. Jodkalium fällt aus der Lösung rotes Quecksilberjodid ( $\text{HgJ}_2$ ) aus, das bei weiterem Zusatz von Jodkalium sich als komplexes Doppelsalz löst.

3. Phosphorige Säure scheidet zuerst einen weißen Niederschlag von Quecksilberchlorür ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) aus, der beim Erwärmen unter Abscheidung von metallischem Quecksilber schwarz wird. Die gleiche Fällung wird durch Zinnchlorürlösung bewirkt.

4. Handelt es sich um sehr geringe Quecksilbermengen, so schlägt man diese auf einem blanken Kupferblech, das durch Äther entfettet wurde, nieder, spült das Blech mit Wasser, Alkohol und Äther ab und bringt es vollkommen trocken in ein unten zugeschmolzenes Glasröhrchen, das etwa eine lichte Weite von 5 mm und eine Länge von 20 cm besitzt und dessen oberer Teil zu einer dünnen, langen Spitze ausgezogen wird. Nach dem Abkühlen erwärmt man das Kupferblech mit einer kleinen Bunsenflamme und steigert die Temperatur allmählich bis zur Glühhitze. Zweckmäßig wird das Röhrchen so befestigt, daß es nicht ganz horizontal geneigt ist. An den kälteren Stellen des Röhrchens setzt sich das sublimierte Quecksilber in Form von winzigen Kügelchen an, die man noch deutlich als solche unter dem Mikroskop erkennen kann. Um die Kügelchen deutlicher sichtbar zu machen, kann man sie durch Erwärmen in die Spitze des Glasröhrchens treiben, die durch Auflegen eines feuchten Fließpapierstreifens gekühlt wird. Schneidet man das Röhrchen an dem Quecksilberbelag ab und stellt es so in ein Reagensglas, auf dessen Boden sich einige Jodkryställchen befinden, daß die Dämpfe des Jods an das Glasröhrchen kommen können, so werden die Quecksilbertröpfchen zackig, krystallin und bekommen eine rote Farbe von gebildetem Quecksilberjodid ( $\text{HgJ}_2$ ). Die Röhrchen kann man oben und unten zuschmelzen und als Beweismaterial aufheben.

### c) Bestimmung.

α) Nach Zerstörung der organischen Substanz, die, wie oben beschrieben, ausgeführt wird, wird das Quecksilber als Sulfid gefällt und nach dem Absetzen auf einem Filter gesammelt, mit Schwefelwasserstoffwasser ausgewaschen, und der Niederschlag unter Zusatz von Bromwasser in Salzsäure gelöst, filtriert und das Brom durch Einleiten von Kohlensäure vertrieben. In diese Lösung wird nach dem Verdünnen mit Wasser erneut Schwefelwasserstoff eingeleitet,

und der Niederschlag auf ein gewogenes Filter oder einen Filtertiegel gebracht, ausgewaschen, bei 100—110° getrocknet und gewogen.

β) Man kann auch den Niederschlag von Quecksilbersulfid noch feucht in einen Kolben mit Glasstopfen bringen und mit gemessener 0,1 oder 0,05 N.-Jodlösung kurze Zeit kräftig schütteln. Der ausgeschiedene Schwefel wird mit 2—5 ccm reinem Schwefelkohlenstoff aufgenommen und das überschüssige Jod mit Natriumthiosulfatlösung zurückgemessen. Durch einen Leerversuch mit den gleichen Mengen Schwefelkohlenstoff und Jodlösung wird der Wirkungswert der Jodlösung festgestellt. Nach der Gleichung,  $\text{HgS} + 2\text{J} = \text{HgJ}_2 + 2\text{S}$ , zeigen 2 Mol Jod 1 Mol Quecksilber an.

Mithin entspricht 1 ccm 0,10 N.-Natriumthiosulfatlösung = 0,01003 g Hg.

#### d) Nachweis kleinster Mengen Quecksilber in Harn, Faeces, organischen Geweben und Luft.

Diese Methoden beruhen darauf, daß das Quecksilber aus der Lösung durch Aluminiumhydroxyd mitgerissen oder auf Kupfer oder Gold niedergeschlagen wird. Man kann das Quecksilber auch als solches oder auf Gold niedergeschlagen, auf der Mikrowaage zur Wägung bringen.

Es seien die Methoden von F. GLASER und A. ISENBURG<sup>1</sup>, A. JOLLES, modifiziert von M. OPPENHEIM<sup>2</sup>, SCHUMACHER und JUNG<sup>3</sup>, H. BUCHTALA<sup>4</sup> erwähnt.

Auf colorimetrischem Wege haben AUTENRIETH und W. MONTIGNY<sup>5</sup> das Quecksilber bestimmt.

Die neuerdings am meisten angewendete Methode des Quecksilbernachweises und seine Bestimmung von A. STOCK<sup>6</sup> sei kurz erläutert.

#### Bestimmung kleinster Mengen Quecksilber nach A. STOCK.

Nachweis in Harn und Speichel: In den Harn (700—1200 ccm) oder den Speichel (150—400 ccm) wird unter Bedeckung des Gefäßes Chlorgas in mäßigem Strome zunächst  $\frac{1}{2}$  Stunde lang in der Kälte, dann noch 1 Stunde lang bei 70—80° auf dem Wasserbade eingeleitet. Über Aufschließungsverfahren bei anderem organischem Material siehe STOCK, CUCUEL, KÖHLE<sup>7</sup>. Hierauf verreibt man das überschüssige Chlor durch mehrstündiges Durchleiten von Luft bei Zimmertemperatur, filtriert, gibt zum Filtrat 20 mg Kupfersulfat und soviel konz. Salzsäure, daß der Chlorwasserstoffgehalt der Flüssigkeit etwa 5% beträgt und fällt nun mit Schwefelwasserstoff in der Kälte etwa vorhandenes Quecksilber zusammen mit Kupfer aus. Der Niederschlag wird nach dem Absetzen, Dekantieren und Auswaschen mit Schwefelwasserstoffwasser in 5 ccm Wasser aufgeschlämmt und durch Einleiten von Chlor in Lösung gebracht. Nachdem man wieder wie oben mit Luft das Chlor vertrieben, filtriert und ausgewaschen hat, verdünnt man auf etwa 250 ccm, säuert mit Salzsäure an und fällt nochmals mit Schwefelwasserstoff in der Kälte. Der nun gereinigte, fast immer dichte, rein schwarze Niederschlag wird nach dem Zentrifugieren, Filtrieren und Auswaschen in 3 ccm Wasser aufgeschlämmt, wieder mit Chlorgas in Lösung gebracht und in die von Chlor befreite, durch ein kleines Filter filtrierte, mit 2 ccm Wasser nachgewaschene Flüssigkeit nach und nach 0,1—0,2 g fein gepulvertes Ammoniumoxalat eingetragen, bis eine blaugrüne Lösung entstanden ist und einige Körnchen Ammoniumoxalat ungelöst bleiben.

In diese Lösung stellt man dann einen  $\frac{1}{2}$  mm dicken, 16 cm langen, zweimal auf 4 cm Länge umgebogenen, gründlichst gereinigten, blanken Kupferdraht so hinein, daß die ganze Flüssigkeit durchsetzt ist und läßt 48 Stunden stehen. Hierauf wird der Kupferdraht durch längeres Eintauchen in Wasser gewaschen, in einem kleinen Exsiccator (Wäagegläschen) über  $\text{P}_2\text{O}_5$  einige Stunden getrocknet, dann in ein auf der einen Seite geschlossenes, 6—7 mm

<sup>1</sup> F. GLASER u. A. ISENBURG: Chem.-Ztg. 1909, **33**, 1258.

<sup>2</sup> M. OPPENHEIM: Zeitschr. analyt. Chem. 1903, **42**, 431.

<sup>3</sup> SCHUMACHER u. JUNG: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **62**, 138; Zeitschr. analyt. Chem. 1902, **41**, 461.

<sup>4</sup> H. BUCHTALA: Zeitschr. physikal. Chem. 1913, **83**, 249.

<sup>5</sup> AUTENRIETH u. W. MONTIGNY: Münch. med. Wochenschr. 1920, **32**, 928.

<sup>6</sup> A. STOCK: Zeitschr. angew. Chem. 1926, **39**, 461, 466.

<sup>7</sup> A. STOCK, CUCUEL, KÖHLE: Zeitschr. angew. Chem. 1933, **46**, 187.

weites, in der Mitte verjüngtes, am anderen Ende fein ausgezogenes, höchst sorgfältig gereinigtes und absolut trockenes Röhrchen (Abb. 20) aus schwer schmelzbarem Glase gebracht und nun in waagrechter Lage zunächst langsam und schließlich einige Minuten bis zum Glühen erhitzt; der verjüngte Teil des Röhrchens wird durch einen nassen Papierstreifen gekühlt.

Das Quecksilbersublimat bildet in dem gekühlten, verjüngten Teil des Röhrchens einen ringförmigen Beschlag oder Tröpfchen, die bei Mengen von 0,02 mg an meist mit bloßem Auge sichtbar sind; unter dem Mikroskop kann man bis zu 0,001 mg (1  $\gamma$ ) noch erkennen.

Zur noch deutlicheren Sichtbarmachung führt man das Quecksilber in sein Jodid über, indem man den abgesprengten Teil des Röhrchens 1 Stunde lang in ein Reagensglas stellt, auf dessen Boden sich einige Körnchen Jod befinden. Die Jodidkryställchen treten bei mikroskopischer Betrachtung schärfer hervor und lassen sich noch bei 0,0002 mg Quecksilber erkennen.

Zur quantitativen Bestimmung kann man sich des von A. STOCK<sup>1</sup> angegebenen colorimetrischen Verfahrens mit Diphenylcarbazon bedienen, welches mit den geringsten Spuren von Quecksilber eine Färbung gibt. Man löst das Quecksilbersublimat in etwa  $\frac{1}{4}$  ccm Chlorwasser in einem möglichst engen Rohr, bläst die Lösung aus der Verengung heraus, spült mit einigen Tropfen Wasser nach und vertreibt durch Luft das überschüssige Chlor. Die Lösung versetzt man mit 1 Tropfen kaltgesättigter Harnstofflösung und colorimetriert nach Zugabe 1 Tropfens Diphenylcarbazonlösung (kaltgesättigte alkoholische Lösung) rasch bei gelbem Licht im 0,5 ccm Tauchgefäß des Mikrocolorimeters nach DUBOSCQ. Als Vergleichslösung dient eine Quecksilberchloridlösung, die, je nach der Menge des zu bestimmenden Quecksilber, in 0,5 ccm 0,1 oder 0,5  $\gamma$  Quecksilberchlorid enthält und der man kurz vor der Bestimmung die gleiche Menge Harnstoff- und Diphenylcarbazonlösung zusetzt.

Man kann auf diese Weise noch 0,05  $\gamma$  Quecksilber quantitativ bestimmen.

In einer neueren Arbeit gibt STOCK<sup>2</sup> eine Verbesserung der quantitativen Bestimmungsmethode bekannt, welche in einer elektrolitischen Abscheidung des Quecksilbers und Messen des Quecksilbertröpfchens unter dem Mikroskop besteht.

Der, wie oben beschriebene, durch zweimalige Fällung gereinigte, 20 mg Kupfer enthaltende Sulfidniederschlag wird mit Chlor wieder in Lösung gebracht und in salzsaurer Lösung 36–48 Stunden lang bei einer Klemmenspannung von  $1,48 \pm 0,02$  V und einer Stromstärke von etwa 4 mA elektrolysiert. Als Anode dient ein 0,5 mm starker Platindraht, als Kathode ein 25 cm langer, 0,5 mm dicker, sorgfältigst gereinigter, mehrfach umgebogener Kupferdraht aus reinstem Kupfer (Elektrolytkupfer), die in ein Becherglas von 20 ccm eintauchen. Nach Beendigung der Elektrolyse wird das auf dem Kupferdraht niedergeschlagene Quecksilber in einem besonders hergerichteten, peinlichst gereinigten Glasrohr sublimiert, das sublimierte Quecksilber durch Zentrifugieren zu einer oder mehreren Kugeln vereinigt, und deren Durchmesser dann mittels eines Mikroskopes mit Meßvorrichtung bestimmt.

Das Quecksilbergewicht in  $\gamma$  ergibt sich aus dem Kugeldurchmesser ( $d$  in  $\mu$ ) zu  $\frac{7,096 \cdot d^3}{10^6}$ .

In der erwähnten Arbeit sind noch alle zu beachtenden Einzelheiten genau angegeben, die dort nachzulesen sind.

Nach STOCK sind auf diese Weise 0,1  $\gamma$  Quecksilber ohne Schwierigkeiten zu bestimmen, erst bei 0,01  $\gamma$  erfordert die Bestimmung besondere Erfahrung und Kenntnis.

Über die Bestimmung des Quecksilbergehaltes in der Luft siehe A. STOCK und CUCUEL<sup>3</sup>.

## 7. Blei.

Das metallische Blei führt durch Verstäubung und Einatmung häufiger zu chronischen Vergiftungen. Giftwirkung besitzen ferner die in Wasser und verd. Mineralsäuren löslichen Bleisalze. Zu ihnen zählen: Bleioxyd, Mennige, Bleichromat, Bleicarbonat, Bleiacetat usw., die zum Teil in der Technik häufige Anwendung finden. Glasuren von Gefäßen enthalten oft nicht unerhebliche Mengen in verd. Säuren löslicher Bleiverbindungen (s. Bd. I, S. 1085).

<sup>1</sup> A. STOCK u. W. ZIMMERMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1928, 41, 546.

<sup>2</sup> A. STOCK u. H. LUX: Zeitschr. angew. Chem. 1931, 44, 200; STOCK, CUCUEL, LUX, KÖHLE: Z. angew. Chem. 1933, 46, 62.

<sup>3</sup> A. STOCK u. CUCUEL: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1934, 67, 122.

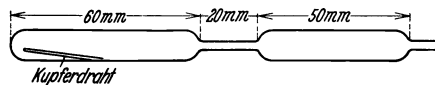
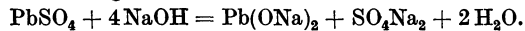


Abb. 20. Bestimmung von Quecksilber.  
(Nach A. STOCK.)

Man kann Blei in der beim Zerstören mit Salzsäure und Kaliumchlorat erhaltenen Lösung dadurch abscheiden und isolieren, daß man der Flüssigkeit einige Tropfen nicht zu verd. Schwefelsäure zusetzt; es fällt alsdann das Blei als schwer lösliches Bleisulfat aus. Auch findet man Blei, zumal wenn mehr vorhanden ist, in dem nach obiger Zerstörung verbleibenden Rückstand, aus dem es nach S. 1389 isoliert werden kann. Wenn man die Zerstörung der organischen Substanz mit Schwefel- und Salpetersäure vorgenommen hat, so bleibt der größte Teil des Bleis als unlösliches Bleisulfat zurück. Über Zerstörung von Knochen, in denen sich Blei anreichert, s. DANCKWORTT<sup>1</sup>. Aus Lösungen kann das Blei als unlösliches Sulfid durch Schwefelwasserstoff gefällt werden.

#### a) Nachweis.

α) Bleilösungen werden durch Schwefelsäure als Bleisulfat gefällt, das in Natronlauge oder Kalilauge löslich ist (Unterschied von Baryum).



Auch in basisch weinsaurem oder essigsäurem Ammonium ist Bleisulfat löslich.

Die Reaktionen stellt man am besten, wenn es sich um kleine Mengen handelt, auf einem Uhrglas, das auf einen dunklen Untergrund gelegt wird, an.

β) Jodkalium gibt mit neutralen Bleilösungen Fällungen von gelbem Bleijodid ( $\text{PbJ}_2$ ).

γ) Kaliumchromat und Kaliumbichromat fällen aus neutralen Bleisalzlösungen gelbes Bleichromat ( $\text{CrO}_4\text{Pb}$ ), das in Essigsäure unlöslich, in Natronlauge dagegen leicht löslich ist.

δ) Durch Elektrolyse wird Blei als Bleisuperoxyd an der positiven Elektrode als brauner Überzug niedergeschlagen. Der Lösung ist vorher etwas reines Kupfersulfat, 0,2—0,5 g, zuzusetzen.

#### b) Bestimmung.

α) Liegen nicht zu kleine Mengen Blei vor, so wird das Blei durch Schwefelsäure gefällt, die Schwefelsäure bis zur Entwicklung weißer Dämpfe abgeraucht und nach dem Erkalten mit Wasser und der doppelten Menge Alkohol versetzt. Der Niederschlag wird im Filtertiegel gesammelt, mit Alkohol ausgewaschen, bei 100° getrocknet und als Bleisulfat ( $\text{SO}_4\text{Pb}$ ) zur Wägung gebracht. Auch elektrolytisch läßt sich das Blei als Bleisuperoxyd durch Wägung oder Titration bestimmen, siehe S. 1414, unten.

β) Titrimetrisch lassen sich kleine Mengen Blei in der Weise bestimmen, daß man es als Bleichromat<sup>2</sup> fällt. Die salpetersaure Bleilösung wird bis zur Trockne verdampft und mit heißem Wasser, dem man etwas Natriumacetat und Essigsäure zugesetzt hat, aufgenommen. Zu dieser Lösung, etwa 100 ccm, setzt man Kaliumbichromatlösung, das durch mehrfaches Umkrystallisieren gereinigt worden ist, zu. Die Lösung muß gelb gefärbt bleiben. Man wartet, bis der Bleichromatniederschlag sich vollständig niedergeschlagen hat, was meistens innerhalb 24 Stunden erreicht ist. Bei sehr geringem Bleigehalt läßt man die Lösung 3 Tage lang in dem mit Glasstopfen verschlossenen Kolben stehen. Alsdann bringt man den Niederschlag auf ein Asbeströhrchen, wäscht dreimal mit geringen Mengen Wasser zuerst den Kolben, dann den Niederschlag aus und löst ihn heiß in wenig reiner 10%iger Salzsäure. Die Lösung gibt man in den Glaskolben zurück, um die geringen Mengen Bleichromat, die sich am Boden festgesetzt haben, zu lösen und wäscht das Asbeströhrchen

<sup>1</sup> DANCKWORTT: Arch. Pharm. 1928, 266, 492.

<sup>2</sup> Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 1910, 33, 203.

mit destilliertem Wasser nach. In die erkaltete Lösung leitet man Kohlensäure zur Verdrängung der Luft ein, fügt nach kurzer Zeit 5 ccm Jodkaliumlösung zu, läßt den Kolben 5 Minuten nach vorherigem Umschwenken stehen, setzt etwas Stärkelösung zu und mißt das ausgeschiedene Jod mit eingestellter 0,05 oder 0,01 N.-Natriumthiosulfatlösung unter Durchleiten von Kohlensäure zurück. Um sich zu überzeugen, daß man auch genügend Jodkalium zugesetzt hat, kann man noch etwas Jodkaliumlösung zusetzen, tritt keine Blaufärbung ein, so ist Bleichromat völlig umgesetzt worden. 0,01 N.-Natriumthiosulfatlösung zeigt 0,6906 mg Blei an.

γ) Colorimetrische Bestimmung. αα) Durch Vergleich der fraglichen Bleilösung mit einer Bleilösung von bekanntem Gehalt, denen Natriumsulfid-lösung zugesetzt wird, läßt sich an der auftretenden braunen Trübung, bzw. Färbung der Gehalt geringer Bleimengen colorimetrisch oder nephelometrisch bestimmen.

ββ) Nachweis von kleinsten Spuren Blei und ihre Bestimmung s. HECKE<sup>1</sup> und FREUND<sup>1</sup>.

Quantitative Bestimmung von Blei in Blut, Urin, Faeces und Knochen.

Über die Bestimmung kleinster Mengen von Blei in organischem Material liegt eine Reihe von Arbeiten vor, nach welchen das Blei sowohl titrimetrisch (FAIRHALL, MINOT, REZNIKOFF<sup>2</sup>, FRETWURST und HERTZ<sup>3</sup>, FROBOESE<sup>4</sup>, SCHÜTZ und BERNHARD<sup>5</sup>), als auch colorimetrisch (TANNAHILL<sup>6</sup>, MEILLÈRE<sup>7</sup>), sowie nephelometrisch (BADHAM und TAYLOR<sup>8</sup>, DANKWORTH und UDE<sup>9</sup>) und elektrolytisch-colorimetrisch<sup>10</sup> bestimmt wird.

Von diesen verschiedenen Methoden sei nur die letztere, als die wohl jetzt gebräuchlichste, näher beschrieben.

Sie zerfällt 1. in die Zerstörung der organischen Substanz und Fällung des Bleies mit Schwefelwasserstoff, 2. in die Trennung des Bleies von den übrigen Schwermetallen auf dem Asbestfilter und 3. in die elektrolytische Abscheidung und colorimetrische Bestimmung des Bleies.

Blut, nicht weniger als 100 ccm, wird in einer Duranglasschale mit 5 Vol.-% konz. Schwefelsäure versetzt, 10—12 Stunden im Trockenschrank bei 120—150° getrocknet und dann in einem elektrischen Muffelofen bei einer Temperatur von 500—530° (nicht über 550°) innerhalb 8 Stunden verascht. Die Asche wird mit 10—15 ccm konz. Salpetersäure und 15—20 ccm konz. Schwefelsäure in der Duranglasschale aufgeköcht, bis weiße Schwefelsäuredämpfe auftreten, dann in einen KJELDAHL-Kolben übergespült und dort in der üblichen Weise unter Zutropfenlassen konz. Salpetersäure bis zur völligen Zerstörung der organischen Substanz weiter erhitzt.

In Ermangelung eines elektrischen Muffelofens kann man die Zerstörung der organischen Substanz wohl auch von vornherein naß mit Schwefelsäure-Salpetersäure in bekannter Weise, wie auf S. 1383, Methode 5 beschrieben, ausführen. Auch bei Organteilen und bei Faeces ist die nasse Zerstörung mit Schwefelsäure-Salpetersäure anzuwenden, da die Schalen und Tiegel im Muffelofen angegriffen werden. Bei Blut ist der geringe Bodensatz durch Kochen mit Wasser in Lösung zu bringen, während man bei Faeces, wenn sich der Niederschlag nicht völlig löst, nach SEISER, NECKE und MÜLLER<sup>11</sup> mit Ammoniak neutralisiert,

<sup>1</sup> Dr. HUGO FREUND: Leitfaden der colorimetrischen Methoden für Chemiker und Mediziner. Wetzlar: Selbstverlag 1928. — HECKE: Deutsch. med. Wochenschr. 1926, 52, 1855.

<sup>2</sup> FAIRHALL, MINOT, REZNIKOFF: Lead poisoning. Baltimore: The Williams and Wilkins Comp. 1926.

<sup>3</sup> FRETWURST u. HERTZ: Arch. Hygiene 1930, 104, 215.

<sup>4</sup> FROBOESE: Arch. Hygiene 1926, 96, 236.

<sup>5</sup> SCHÜTZ u. BERNHARD: Zeitschr. Hyg., Infekt.-Krankh. 1925, 104, 441.

<sup>6</sup> TANNAHILL: The Med. Journ. of Austr., Febr. 1929.

<sup>7</sup> MEILLÈRE: Compt. rend. Soc. Biologie 1903, 55, 517.

<sup>8</sup> BADHAM u. TAYLOR: Extrakt from the Rep. Dir. Gen. Publ. Health. New South Wales 1927.

<sup>9</sup> DANKWORTH u. UDE: Arch. Pharm. 1926, 264, 712.

<sup>10</sup> P. SCHMIDT u. Mitarbeiter: In verschiedenen Veröffentlichungen, zusammengefaßt in „Über die Diagnostik der Bleivergiftung im Lichte moderner Forschung“ von P. SCHMIDT und F. WEYRAUCH. Jena: Gustav Fischer 1933.

<sup>11</sup> SEISER, NECKE, MÜLLER: Arch. Hygiene 1928, 99, 158.

filtriert und den Rückstand zur Lösung von etwa vorhandenem Bleisulfat mit Natriumacetatlösung auskocht und das Filtrat mit dem ersten Filtrat vereinigt.

Die schwefelsauren Lösungen werden mit Ammoniak neutralisiert; bei Blut erkennt man den Neutralisationspunkt durch die Trübung von Eisenhydroxyd, bei Faeces bedient man sich des p-Nitrophenols als Indicator. Nach Zugabe von einigen Tropfen Salpetersäure bis zum Verschwinden der Eisentrübung bzw. bis zur Gelbfärbung des Indicators leitet man in die schwach saure Lösung einige Minuten lang einen lebhaften Schwefelwasserstoffstrom ein und gibt dann tropfenweise Ammoniak zu, bis ein tiefschwarzer Niederschlag von FeS ausfällt. Bei Faeces muß man zuvor etwa 5 mg zweiwertiges Eisen in Form einer Lösung von MOHR'schem Salz zusetzen. Nach Verdünnen auf 200 ccm läßt man über Nacht unter  $H_2S$ -Druck stehen.

Die Vorverarbeitung von Urin wird nach LITZNER, WEYRAUCH, BARTH<sup>1</sup>, da die vorhandenen großen Phosphatmengen sehr stören, in anderer Weise ausgeführt. Sie fallen unter Zugabe von Calciumchlorid in essigsaurer Lösung Calcium und Blei zusammen als Oxalat, führen das Oxalat in Oxyd über und scheiden aus der salpetersauren und schwach ammoniakalisch gemachten Lösung in Gegenwart von Kupfer das Blei als Bleisulfid ab.

1 Liter Urin wird mit Essigsäure (50%) mittels Methylorange-papiers bis zum beginnenden Umschlag in Rot neutralisiert. Dann fügt man etwa 3 ccm der 50% Essigsäure, 5 ccm einer 5% Chlorcalciumlösung und unter beständigem Umrühren tropfenweise 10 ccm gesättigte Kaliumoxalatlösung (33%) hinzu und läßt über Nacht stehen. Nachdem die überstehende Flüssigkeit klar abgesehen ist, wird der Niederschlag 5 Minuten lang aufgekocht, damit er körnig wird, und durch einen GOOCH-Tiegel filtriert. Nach dem Trocknen im Trockenschrank wird der Tiegel 4 Stunden im Muffelofen bei 500° erhitzt, sein Inhalt dann in 20% Salpetersäure gelöst, mit Wasser verdünnt und noch 10 ccm Salpetersäure (20%) und 5 ccm Kupfersulfatlösung (1%) zugegeben. Nun neutralisiert man vorsichtig mit Ammoniak bis zum Auftreten der blauen Färbung, nimmt den Ammoniaküberschuß mit Salpetersäure (20%) wieder weg und setzt 1—2 Tropfen Ammoniak zu, wodurch eine hellblaugrüne Färbung und ganz schwach alkalische Reaktion entsteht, welche bei der Fällung mit Schwefelwasserstoff in ganz schwach sauer übergeht; es ist dies die für die Ausfällung der Sulfide günstigste Bedingung.

Bei der Untersuchung von Knochen wird gleichfalls die Fällung mit Kaliumoxalat ausgeführt. Die bei 120—150° getrockneten Knochen werden bei höchstens 550° verascht. 3 g der Knochenasche werden in einem 1-Liter-Becherglas in 30 ccm konz. Salpetersäure gelöst und zur Klärung etwas Perhydrol zugesetzt. Nach Verdünnen mit etwa 500 ccm Wasser wird mit Ammoniak gegen Methylorangepapier neutralisiert, nach Zusatz von 3 ccm Essigsäure (1 Tl. Eisessig + 1 Tl. Wasser) auf etwa 900 ccm verdünnt und unter Umrühren mit 25 ccm gesättigter Kaliumoxalatlösung versetzt. Dann wird wie bei Urin weiter verfahren.

Die Fällung läßt man über Nacht unter  $H_2S$ -Druck stehen. Die so erhaltenen Sulfide werden nun durch ein SCHOTT'sches Glasfilter abfiltriert und zweimal mit Wasser nachgewaschen. Zur Entfernung von Eisen und Mangan übergießt man den Niederschlag auf dem Filter mit frisch bereitetem schwefelsäurehaltigem, mit Schwefelwasserstoff gesättigtem Alkohol (50 ccm Wasser mit Schwefelwasserstoff sättigen, dann 50 ccm Alkohol (96%) und 3 ccm konz. Schwefelsäure zusetzen) und läßt eine halbe Stunde lang einwirken; nach Ablauflassen des Alkohols wäscht man zweimal mit Wasser, läßt, um das Kupfer zu beseitigen,  $\frac{1}{4}$  Stunde lang Cyankaliumlösung (3%) einwirken und wäscht wieder zweimal mit Wasser nach. Da Eisen und Kupfer sich oft gegenseitig einschließen, wird die  $\frac{1}{4}$ stündige Behandlung mit Schwefelsäure-Schwefelwasserstoff-Alkohol wiederholt und dann nochmals zweimal nachgewaschen. Nun wird das Bleisulfid auf dem Filter einige Male mit heißer Salpetersäure (20%) übergossen, in ein Saugröhrchen abgesaugt und zweimal mit Wasser nachgespült.

Die salpetersauren Lösungen werden nun noch mit 10 ccm Salpetersäure (20%) und 5 ccm Kupfersulfatlösung (1%) versetzt, mit Ammoniak neutralisiert (Blaufärbung) und dann soviel stickoxydfreie Salpetersäure zugegeben, daß die Säurekonzentration etwa 0,7% beträgt.

Für die Elektrolyse werden als Anode nach SEISER, NECKE und MÜLLER WINKLER'sche Netzelektroden von etwa 50 mm Netzhöhe verwendet. Wir bedienten uns Platindrähte von 1 mm Stärke, die mit Platindrahtnetz umwickelt und von der spiralförmigen Kathode aus demselben Draht umgeben sind. Nach Beendigung der Elektrolyse (etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde) wird unter Stromdurchgang mit Wasser völlig ausgewaschen, bis die Stromstärke auf wenige Milliampère abgesunken ist. Dann nimmt man die Anode heraus, schleudert das anhaftende Wasser ab und stellt sie in eine farblose Lösung von Tetramethyldiamido-

<sup>1</sup> LITZNER, WEYRAUCH, BARTH: Arch. Gewerbepath. u. Gewerbehyg. 1931, 330.

diphenylmethan in Eisessig, wobei das niedergeschlagene Bleisuperoxyd die bekannte blaue Farbe erzeugt.

Aus einer Bleinitratstandardlösung, die in 1 ccm 0,1 mg Blei enthält und zur Haltbarkeit mit einigen Tropfen Salpetersäure angesäuert ist, werden in derselben Weise durch elektrolytische Abscheidung des Bleisuperoxyds eine Reihe von Vergleichsproben hergestellt, welche annähernd dieselben Bleimengen enthalten.

Beträgt die abgeschiedene Bleimenge über 0,3 mg, wobei sich ein gelblichbrauner Belag auf der Anode zeigt, so verwendet man einen aliquoten Teil der blaugefärbten Lösung zu dem colorimetrischen Vergleich, oder man bestimmt das Blei jodometrisch durch Titration mit 0,005 N.-Thiosulfatlösung in bekannter Weise. Sind die Bleimengen noch größer, über 0,5 mg, was aber selten vorkommen dürfte, so muß die Säurekonzentration verdoppelt oder verdreifacht werden, weil sonst das Blei anodisch nicht quantitativ abgeschieden wird, oder man bestimmt in diesen Fällen das Blei durch Fällen als Chromat und Titrieren mit Thiosulfat.

Sämtliche Reagenzien müssen natürlich absolut bleifrei sein. In dieser Beziehung geben die Autoren folgendes an: bleifreies Ammoniak wird durch Sättigen von destilliertem Wasser aus einer Ammoniakbombe hergestellt. Der Asbest ist durch Kochen mit konz. Schwefelsäure und etwas Salpetersäure zu reinigen. Die Cyankaliumlösung wird mit Wasserstoffsuperoxyd aufgekocht und durch Asbest filtriert. Das Natriumacetat wird durch Neutralisation von reinem Natriumhydroxyd mit Essigsäure hergestellt. Das Tetramethyldiamidodiphenylmethan wird aus heißem Alkohol unter Zusatz von etwas Schwefelammonium als Reduktionsmittel umkrystallisiert und mit Wasser gewaschen. Der Eisessig darf durch die Farbbase nicht gefärbt werden. Das destillierte Wasser, die Salpetersäure und Schwefelsäure müssen gleichfalls bleifrei sein und sind nötigenfalls durch Destillation bleifrei zu machen. Die übrigen Reagenzien, unter Garantie als chemisch rein bezogen, sind in der Regel bleifrei. Calciumchlorid wird bleifrei durch Auflösen von Calc. carbon. praec. pro analysi Merck in chemisch reiner Salzsäure und Filtrieren durch ein Asbestfilter hergestellt.

Die Genauigkeit der Methode liegt nach den Autoren innerhalb 0,02 mg; Fehler über 0,02 mg kommen selten vor. Bei Bleimengen bis 0,06 mg findet man etwas zuviel, von 0,07 mg an etwas zu wenig Blei.

Der Nullwert liegt nicht bei 0,00, sondern etwa bei 0,01, gelegentlich 0,03 mg, wahrscheinlich bedingt durch aktiven Sauerstoff, der auf der Platinoberfläche der Anode haftet. Es genügt jedoch anscheinend schon ein Gehalt von 0,01 mg Blei, um die Adsorption des Sauerstoffs auf der Anode zu verhindern.

Im Wasser läßt sich Blei nach dem Eindampfen von mehreren Litern auf ein kleines Volumen nach vorheriger Zugabe von etwas Salzsäure und einigen Körnchen Kaliumchlorat nach der Chromatmethode jodometrisch, wie oben ausgeführt, bestimmen.

## 8. Thallium.

Die Thalliumsalze werden in der Technik z. B. in der Glasindustrie und als Schädlingsbekämpfungsmittel gebraucht, sie haben stark giftige Eigenschaften, die denen des Bleis ähneln. Durch den Harn wird das Thallium ausgeschieden (s. Bd. I, S. 1089).

**Nachweis.** Entweder schließt man die Leichenteile mit Kaliumchlorat und Salzsäure oder mit Schwefelsäure-Salpetersäure auf. Aus diesen Lösungen kann nach vorheriger Neutralisation das Thallium durch Schwefelammonium ausgefällt werden. Schwefelwasserstoff fällt in mineralsaurer Lösung kein Thallium aus. Am besten wird es durch Elektrolyse auf Platin aus den Lösungen niedergeschlagen. Das niedergeschlagene Metall wird in Schwefelsäure gelöst; diese Lösung kann zur näheren Identifizierung dienen.

**Reaktionen.**  $\alpha$ ) Im Spektralapparat zeigt sich nahe bei  $E$  eine intensiv grüne Linie.

$\beta$ ) Salzsäure fällt aus schwach saurer Lösung einen weißen käsigen Niederschlag aus, Jodkalium und Platinchloridchlorwasserstoffsäure erzeugen gelbe Fällungen.

$\gamma$ ) Auf Zusatz von Schwefelammonium fällt schwarz-braunes Sulfid aus.



## 9. Silber.

Die löslichen Silbersalze besitzen stark ätzende Wirkung. Für den forensen Chemiker kommt nur Silbernitrat, seltener Silbersulfat in Betracht, das in der Technik und Arzneikunde angewendet wird (s. Bd. I, S. 1081).

Bei der Zerstörung der organischen Substanz mit Salzsäure und Kaliumchlorat findet sich das Silber als unlösliches Chlorsilber in dem Rückstand. Nach dem Trocknen und Entfetten wird der Rückstand mit Natriumcarbonat und Salpeter gemischt und geschmolzen. In der Schmelze findet sich metallisches Silber, das auf einem Filter gesammelt und nach dem Auswaschen in Salpetersäure gelöst wird. Nach dem Abdampfen der Salpetersäure wird der Rückstand mit Wasser aufgenommen und dient zum Nachweis des Silbers.

a) **Nachweis.**  $\alpha$ ) Auf Zusatz von Salzsäure entsteht ein weißer Niederschlag von Chlorsilber, der in Ammoniak löslich ist.  $\text{AgCl} + \text{NH}_3 = \text{NH}_3\text{AgCl}$ .

$\beta$ ) Jodkalium gibt mit Silbersalzen einen gelben Niederschlag von Jodsilber, der in Ammoniak unlöslich ist, leicht löslich dagegen in Natriumthiosulfat und Cyankalium.

$\gamma$ ) Kaliumchromat fällt rotbraunes Silberchromat, das in Essigsäure unlöslich, dagegen in Salpetersäure und Ammoniak leicht löslich ist.

$\delta$ ) Schwefelwasserstoff scheidet schwarzes Schwefelsilber ab, das in Ammoniak und Schwefelalkalien unlöslich, in warmer Salpetersäure leicht löslich ist.

$\epsilon$ ) Wird die ammoniakalische Silberlösung mit Formaldehyd versetzt, so scheidet sich nach einiger Zeit metallisches Silber im Reagensglas als Silber Spiegel ab, den man nach vorsichtigem Abspülen mit Wasser, Alkohol und Äther als Beweisstück aufheben kann.

b) **Bestimmung.**  $\alpha$ ) Gewichtsanalytisch läßt sich Silber als Chlorsilber fällen, in einem Filtertiegel sammeln und nach dem Auswaschen und Trocknen bei  $130^\circ$  zur Wägung bringen.

$\beta$ ) Maßanalytisch läßt sich Silber am besten mit 0,1 oder 0,01 N.-Rhodanlösung nach VOLHARD in salpetersaurer Lösung und unter Zusatz von Ferriammonsulfatlösung als Indicator bestimmen.

1 ccm 0,1 N.-Rhodanlösung = 0,0127 g Silber.

## 10. Wismut.

Die Wismutverbindungen finden kosmetische und medizinische Anwendung. Wismutsubnitrat und Wismutcarbonat sind die Salze, die am meisten Anwendung finden. Auch organische Wismutverbindungen werden in der Arzneikunde gebraucht.

a) **Nachweis.** In Organteilen kann man neben den bekannten Methoden Wismut nach DALCHE und VILLEJEAN<sup>1</sup> in der Weise nachweisen, daß man sie mit Salpetersäure bei Gegenwart von Kaliumbisulfat verkohlt und mit Schwefelsäure vollkommen zerstört. Nach dem Abrauchen der Schwefelsäure ist der Rückstand in wenig Säure zu lösen und durch Schwefelwasserstoff zu fällen.

Reaktionen.  $\alpha$ ) Wismutsulfid ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ) ist dunkelbraun, unlöslich in Schwefelammonium, löslich in warmer Salzsäure.

$\beta$ ) Durch Zusatz von Wasser bildet sich aus dem Wismutnitrat ein weißes basisches Salz, das in Wasser unlöslich ist und je nach der Menge zugesetzten Wassers eine wechselnde Zusammensetzung besitzt. Setzt man vor dem

<sup>1</sup> DALCHE u. VILLEJEAN: C. 1888, 229.

Wasserzusatz Chlorammonium zu, so scheidet sich Wismutoxychlorid ( $\text{BiOCl}$ ) aus, das im Gegensatz zu Antimon in Weinsäure unlöslich ist.

$\gamma$ ) Jodkalium fällt aus Wismutlösungen schwarzvioletttes Wismutjodid ( $\text{BiJ}_3$ ) aus, das in einem Überschuß des Fällungsmittels löslich ist.

$\delta$ ) Reaktion nach LÉGER. Fügt man zu einer schwach salpetersauren Lösung von Wismutnitrat Cinchoninreagens im Überschuß zu, so fällt ein orangefarbener Niederschlag, der in Alkohol löslich ist, aus. Die zu untersuchende Lösung muß frei sein von Salzsäure und anderen Metallen der Schwefelwasserstoffgruppe. Das Reagens besteht aus einer Lösung von 1 g Cinchonin in hinreichender Menge Salpetersäure, der man 2 g Jodkalium zusetzt und auf 100 g Wasser auffüllt.

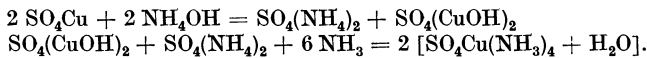
b) **Bestimmung.** Man fällt das Wismut in der Wärme aus schwach saurer Lösung als Sulfid aus, das im Filtriegel gesammelt, mit Schwefelwasserstoffwasser und zur Entfernung von Schwefel weiterhin mit Alkohol und reinem Schwefelkohlenstoff und alsdann wieder mit Alkohol und Äther ausgewaschen wird. Den Niederschlag trocknet man bei  $100^\circ$  und bringt ihn zur Wägung. Unter Umständen ist eine doppelte Fällung mit Schwefelwasserstoff erforderlich.

## 11. Kupfer.

Wohl alle menschlichen und tierischen Organe enthalten minimale Spuren von Kupfer, zuweilen auch deutlichere Mengen. Die Kupfersalze finden in der Technik und Medizin, in letzterer allerdings nur eine untergeordnete Anwendung. Viele Kupfersalze dienen zur Schädlingsbekämpfung. Verbindungen der Arsenigen Säure mit Kupfer sind bereits beim Arsen besprochen (s. Bd. I, S. 1078).

a) **Nachweis.**  $\alpha$ ) Schwefelwasserstoff fällt aus saurer Lösung schwarzes Kupfersulfid ( $\text{CuS}$ ), das in Schwefelammonium in geringer Menge löslich, in Schwefelnatrium jedoch unlöslich ist.

$\beta$ ) Ammoniak bewirkt in Kupfersalzen eine blaue Fällung, die unter Bildung eines komplexen Salzes in überschüssigem Ammoniak mit intensiv blauer Farbe sich auflöst.



$\gamma$ ) Jodkalium fällt aus Kupfersalzlösungen weißes Kupferjodür ( $\text{Cu}_2\text{J}_2$ ).

$\delta$ ) Ferrocyanalilösung fällt rotbraunes Ferrocyan Kupfer ( $\text{Fe}[\text{CN}_6]\text{Cu}_2 + 7 \text{H}_2\text{O}$ ) aus.

$\epsilon$ ) Ein blanker Eisennagel überzieht sich nach einigen Stunden mit rotem metallischem Kupfer.

b) **Bestimmung.**  $\alpha$ ) Das Kupfer wird aus schwach salzsaurer, warmer Lösung als Kupfersulfid gefällt. Den mit Schwefelwasserstoffwasser ausgewaschenen Niederschlag löst man in warmer Salpetersäure, verdünnt mit viel Wasser und leitet in die warme Lösung erneut Schwefelwasserstoff ein. Den Niederschlag sammelt man auf einem Filter, wäscht mit Schwefelwasserstoffwasser aus und bringt ihn feucht samt Filter in einen gewogenen Porzellantiegel, verascht vorsichtig und glüht. Den Rückstand raucht man zweimal mit konz. Salpetersäure ab und glüht abermals bis zum konstanten Gewicht. Der Glührückstand ist als Kupferoxyd ( $\text{CuO}$ ) in Rechnung zu setzen.

$\beta$ ) **Elektrolytische Bestimmung.** Den Schwefelwasserstoffniederschlag löst man in konz. Salpetersäure, verdampft zur Trockene, raucht mit wenig Schwefelsäure ab, nimmt mit Wasser auf, setzt 10 ccm 2 N.-Schwefelsäure zu, verdünnt die ganze Lösung mit Wasser auf 100 ccm und elektrolysiert bei 2—2,5 V. Klemmenspannung und 0,2 Amp. Am besten scheidet man das Kupfer auf einer Netzelektrode ab. Durch Erwärmen auf  $70$ — $80^\circ$  wird die Elektrolyse

beschleunigt, so daß nach 2 Stunden alles Kupfer ausgeschieden ist. Mittels Heber läßt man die Lösung unter ständigem Zufließen von Wasser ablaufen. Alsdann stellt man den Strom ab, taucht die Elektrode mehrmals in destilliertes Wasser, dann in Alkohol, trocknet bei  $80^{\circ}$  und wägt nach dem Erkalten. Bevor das Auswaschen vorgenommen wird, überzeugt man sich, ob auch alles Kupfer ausgefällt ist. Zu diesem Zwecke entnimmt man der Lösung einige Tropfen und setzt Ferrocyankalilösung zu; tritt keine Rotfärbung auf, so ist alles Kupfer ausgefällt.

γ) Colorimetrische Bestimmung. Das Kupfersulfid wird in verd. Salpetersäure gelöst, zur Trockne verdampft und mit 25 ccm etwa N.-Schwefelsäure aufgenommen. Diese Lösung bringt man in einen geeigneten Glaszylinder und setzt tropfenweise 1%ige Ferrocyankalilösung zu. Zum Vergleich dienen Kupfersulfatlösungen von bekanntem Kupfergehalt, für den man den gleichen Glaszylinder und die gleichen Reagens- und Flüssigkeitsmengen verwendet. Die colorimetrische Methode ist nur bei geringen Kupfermengen anwendbar.

## 12. Cadmium.

Die Cadmiumsalze finden nur geringe Verwendung. Als Malerfarbe wird Cadmiumsulfid benutzt (s. Bd. I, S. 1077).

a) **Nachweis.** α) Schwefelwasserstoff fällt gelbes Cadmiumsulfid (CdS).

β) Glüht man mit dem Lötrohr auf der Kohle eine Mischung von Cadmiumsulfid und Natriumcarbonat in der Oxydationsflamme, so bildet sich ein brauner Belag, dessen äußerer Saum bläulich schimmert, Pfauenaug.

b) **Bestimmung.** α) Man fällt das Cadmium als Sulfid aus, der ausgewaschene Niederschlag wird in verd. warmer Schwefelsäure gelöst, filtriert, in einem gewogenen Tiegel eingedampft, mit aufgelegtem Deckel schwach geglüht und als Cadmiumsulfat,  $\text{CdSO}_4$ , zur Wägung gebracht.

β) Elektrolytische Bestimmung. Man schlägt das Cadmium auf einer gewogenen, mit Kupfer überzogenen Platinnetzelektrode elektrolytisch nieder. Die Lösung des Cadmiumsulfates wird mit Natronlauge unter Zusatz von Phenolphthalein als Indicator ganz schwach alkalisch gemacht. Sodann fügt man soviel Cyankaliumlösung zu, bis sich das durch die Natronlauge ausgefällte Cadmiumhydroxyd eben wieder gelöst hat und elektrolysiert. Die auf etwa 100 ccm verdünnte Lösung elektrolysiert man bei 0,5—0,7 Ampère und 5 Volt Klemmenspannung. Dann erhöht man die Ampèrezahl auf 1—1,2 und elektrolysiert noch 1 Stunde. Man wäscht unter Abhebern der Flüssigkeit mit Wasser aus, unterbricht den Strom und spült die Elektrode noch mit Alkohol ab, trocknet bei  $100^{\circ}$  und bringt das Cadmium (Cd) zur Wägung. Zur Sicherheit, ob alles Cadmium niedergeschlagen ist, kann man die Flüssigkeit nach vorherigem Ansäuern mit Salzsäure noch mit Schwefelwasserstoff prüfen. Vorsicht beim Ansäuern, da Blausäure entweicht.

## 13. Zink.

Die Zinksalze finden medizinische und technische Anwendung. Zinkweiß, Zinkoxyd, Zink dienen als Malerfarbe. Alle in Wasser und verdünnten Säuren löslichen Zinksalze wirken giftig (s. Bd. I, S. 1075).

a) **Nachweis.** 1. Durch Schwefelwasserstoff wird in essigsaurer und ammoniakalischer Lösung Zink als weißes Zinksulfid gefällt, das in Mineralsäuren löslich ist.

2. Ferrocyankaliumlösung fällt weißes Ferrocyanzink  $[\text{Fe}(\text{CN})_6\text{Zn}_2]$ , sehr scharfe Reaktion 0,5 mg.

3. Wird die salpetersaure Zinklösung mit etwas Kobaltnitratlösung auf einen Fließpapierstreifen gebracht, getrocknet und derselbe an einer Platinspirale verbrannt und geglüht, so verbleibt eine grüne Asche, RINNMANN'S Grün.

b) **Bestimmung.** Der in essigsaurer oder ammoniakalischer Lösung durch Schwefelwasserstoff erzeugte Niederschlag von Zinksulfid wird nach dem Auswaschen in verd. Salzsäure gelöst und die wäßrige, klare Lösung mit Natriumcarbonat bis zur bleibenden Trübung versetzt, alsdann zum Kochen erhitzt und noch Natriumcarbonatlösung bis zur schwach alkalischen Reaktion zugesetzt. Der durch Dekantation gewaschene Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt und getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wird möglichst vollständig von dem Filter entfernt, und das zusammengerollte Filter nach vorherigem Befeuchten mit einer Ammoniumnitratlösung am Platindraht über einem Tiegel verascht. Nach Zugabe des Niederschlages wird der Tiegel bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Das Zink wird als Zinkoxyd ( $ZnO$ ) zur Wägung gebracht.

Auch kann das Zink als Phosphat bestimmt werden.

c) **Nachweis von Zink in Lebensmitteln.** Durch Befeuchten der zu prüfenden Lebensmittel mit konz. Salpetersäure und Schwefelsäure, vorsichtiges Verkohlen in einer Porzellanschale und späteres Veraschen läßt sich das Zink von der organischen Substanz befreien.

#### 14. Chrom.

Die Chromverbindungen, sowohl der Chromoxyde, als auch der Chromsäure, finden in der Technik als Malerfarbe Anwendung. Die Chromsäure dient in der Medizin als Ätzmittel. Die Salze, die sich vom Chromoxyd ableiten, haben geringe Giftigkeit, während der Chromsäure und den chromsauren und überchromsauren Salzen starke Giftwirkung zukommt. Im Gang der toxikologischen Analyse wird das Chrom zum Nachweis durch die Salpeterschmelze in Chromsäure übergeführt (s. Bd. I, S. 1088).

a) **Nachweis.** Aus der mit Essigsäure angesäuerten Schmelze kann die Chromsäure durch Bariumsalze gefällt werden. Es entsteht ein gelber Niederschlag von Bariumchromat ( $CrO_4Ba$ ). Durch Bleinitratzusatz wird gelbes Bleichromat gefällt, das in Natronlauge löslich ist.

β) Schüttelt man die schwefelsaure Lösung von Chromaten mit einigen Kubikzentimetern Äther und fügt vorher einen Tropfen Wasserstoffsperoxydlösung zu, so färbt sich der Äther blau.

b) **Bestimmung.** α) Da nach dem Gang der Analyse chromsaures Salz vorliegt, so säuert man die Schmelze mit Salzsäure an und erwärmt die wäßrige Lösung zwecks Reduktion der Chromsäure auf dem Wasserbade unter Zusatz von Alkohol. Wenn der Geruch nach Alkohol verschwunden und die Lösung grün gefärbt ist, fügt man Ammoniak in geringem Überschuß zu und läßt das gefällte Chromhydroxyd absetzen. Man wäscht durch Dekantation den Niederschlag mehrmals aus, löst ihn in wenig überschüssiger Salzsäure und fällt erneut durch Ammoniak. Nach dem Auswaschen mit heißem Wasser und Trocknen bringt man den Niederschlag in einen Porzellantiegel und glüht bis zum konstanten Gewicht. Zur Wägung gelangt das Chrom als Chromoxyd ( $Cr_2O_3$ ).

#### 15. Uran.

Die Uransalze finden als Zusätze zu Glasflüssen und in der Porzellanmalerei Anwendung.

In Wasser und verd. Säuren lösliche Uransalze wirken stark giftig. Zu ihrem Nachweis wird die Zerstörung der Leichenteile zweckmäßig mit Kaliumchlorat und Salzsäure durchgeführt.

**Nachweis.** Durch Schwefelwasserstoff werden die Uranverbindungen nicht, wohl aber durch Schwefelammonium hellgrün gefällt, das schnell in dunkelbraun übergeht. In Ammoniumcarbonat ist dieser Niederschlag löslich. Wird der Niederschlag mit Kaliumsulfhydrat digeriert, so geht er in Uranrot über. Durch ätzende und kohlen saure Alkalien werden Uranoxydsalze gelb gefällt.

Uranverbindungen färben die Phosphorsalz- und Boraxperle in der reduzierenden Flamme grün, in der oxydierenden Flamme gelb, nach dem Erkalten gelbgrün. Die Perlen zeigen Fluorescenz.

## 16. Barium.

Die Bariumsalze finden in der Medizin und in der Technik Anwendung. Das Bariumsulfat, das wegen seiner Unlöslichkeit ungiftig ist, wird bei Röntgenaufnahmen verwendet und dient auch als Anstrichmittel. Die in Wasser und verd. Säuren löslichen Bariumverbindungen, z. B. Bariumchlorid, Bariumcarbonat, Bariumsilicofluorid u. a. m. sind für die forense Chemie beachtenswert, da vielfach diese Bariumverbindungen zum Töten von Ungeziefer dienen.

Wichtig ist es deshalb festzustellen, ob in Wasser oder in verd. Säuren lösliche Bariumsalze im Magen- und Darminhalt vorhanden sind. Bei Anwesenheit von Bariumhydroxyd reagiert der Mageninhalt alkalisch.

Im Gang der toxikologischen Analyse wird das Barium durch Zusatz von Schwefelsäure nach vorheriger Zerstörung der organischen Substanz als unlösliches Bariumsulfat abgeschieden. Zum Teil findet es sich als solches auch in den noch unzerstörten Anteilen und wird bei deren weiteren Behandlung durch Schmelzen mit Natriumcarbonat und Salpeter aufgeschlossen. Das in der Schmelze sich befindende Bariumcarbonat wird abfiltriert, ausgewaschen und in verd. Essigsäure gelöst. Diese Lösung wird zum Nachweis benutzt.

**a) Nachweis.** 1. Gesättigte Strontiumsulfatlösung erzeugt einen Niederschlag von Bariumsulfat.

2. Mit Kaliumdichromatlösung entsteht ein gelber Niederschlag von Bariumchromat ( $\text{CrO}_4\text{Ba}$ ), der in verd. Salzsäure löslich ist.

3. Dampft man einige Tropfen der Lösung mit Salzsäure ein und bringt den Rückstand in die nicht leuchtende Bunsenflamme, so tritt eine Grünfärbung auf; im Spektralapparat zeigen sich typische grüne Linien.

**b) Bestimmung.** Das Barium wird in schwach salzsaurer, zum Kochen erhitzter Lösung mit verd. heißer Schwefelsäure als Bariumsulfat gefällt, der Niederschlag nach dem Absetzen filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filter mit Inhalt kann feucht verkohlt und dann geglüht werden, man muß dann aber, um etwa reduziertes Bariumsulfat wieder zu oxydieren, mit einigen Tropfen konz. Schwefelsäure abrauchen; schließlich wird der Rückstand bis zur Konstanz geglüht und als Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) gewogen.

## 17. Strontium.

Die Salze des Strontiums finden in der Technik, z. B. in der Zuckerindustrie und zu Feuerwerkszwecken, Anwendung. Das Strontium verhält sich ähnlich wie das Barium und kann in gleicher Weise isoliert werden.

**Nachweis.** 1. Gesättigte Gipslösung erzeugt einen weißen Niederschlag von Strontiumsulfat.

2. Die salzsaure Lösung färbt die Bunsenflamme carmoisinrot. Die Bestimmung erfolgt als Sulfat.

## II. Freie Alkalien und Erdalkalien.

Zu den freien Alkalien und Erdalkalien, die ätzend auf Schleimhäute wirken, sind Kaliumhydroxyd, Natriumhydroxyd, Bariumhydroxyd, Ammoniak und auch die in ihrer ätzenden Wirkung schwächer wirkenden Carbonate der Alkalien zu rechnen. Meist zeigen sich bei Einnahme dieser Alkalien die typischen Verätzungen. Das Gewebe der Speiseröhre und des Magens reagiert alkalisch, allerdings kann die alkalische Reaktion durch die Säure des Magens im Mageninhalt schon aufgehoben sein. Freies Ammoniak läßt sich geruchlich und beim Erwärmen des alkalisch reagierenden Mageninhaltes oder des Erbrochenen mittels roten Lackmuspapiers feststellen, jedoch trifft dieses nur bei frischen Objekten zu, da bei eintretender Zersetzung sich Ammoniak aus organischen Stoffen bildet.

Um die ätzenden Alkalien zu fassen, was aber mit Ausnahme von Barium in den edleren Organen, wie Herz, Niere, Milz, Leber und Gehirn, kaum von Erfolg begleitet sein dürfte, unterwirft man Mageninhalt und Erbrochenes der Dialyse, Seite 1422. Besser jedoch ist es, die ätzenden Alkalien vermittels Alkohol aus den Objekten auszuziehen.

### 1. Ammoniak und Ammoniumcarbonat.

Durch vorsichtige Destillation läßt sich das Ammoniak aus den Objekten übertreiben. Man fängt es in Alkohol auf oder setzt besser noch dem Objekt Alkohol zu und treibt das Ammoniak bei niederer Temperatur mit dem Alkohol über. Da nun ein Teil des Ammoniaks an die Säuren des Magens gebunden sein kann, so fügt man dem Destillationsrückstand Magnesiumoxyd und Alkohol zu und destilliert, damit sich nicht aus den Eiweißstoffen Ammoniak abspaltet, bei möglichst geringer Erwärmung den Alkohol mit dem Ammoniak ab.

**a) Nachweis.** Es ist zu berücksichtigen, daß normalerweise sich im Mageninhalt und Erbrochenen Ammoniumsalze vorfinden können. Es ist deshalb unerläßlich, neben dem Nachweis auch die Menge des Ammoniaks festzustellen.

$\alpha$ ) Ein Teil des Destillates wird in einem Reagensglas erwärmt. Man legt darüber Fließpapier, das mit verd. Kupfersulfatlösung getränkt ist. Eine Blaufärbung durch gebildetes komplexes Kupferammoniumsalz zeigt Ammoniak an. Wird das Fließpapier statt mit Kupfersulfat mit Mercurinitratlösung befeuchtet, so bildet sich ein schwarzer Flecken von Mercuroammoniumnitrat ( $\text{NO}_3\text{NH}_2\text{Hg}_2$ ).

$\beta$ ) Ein Teil des Destillates wird unter Zusatz von etwas Salzsäure und Platinchlorwasserstoffsäure auf dem Wasserbade abgedunstet. Bei Gegenwart von Ammoniak kann man unter dem Mikroskop die regulären Krystalle des Platinammoniumdoppelsalzes feststellen [ $\text{PtCl}_6(\text{NH}_4)_2$ ].

**b) Bestimmung.**  $\alpha$ ) In einem aliquoten Teil des Objektes bzw. Destillates kann man das Ammoniak in der Weise bestimmen, daß man es in einer gemessenen Menge 0,5 N.-Salzsäure auffängt und die überschüssig vorgelegte Säure mit 0,5 N.-Alkalilauge unter Verwendung von Methylorange oder Methylrot zurückmißt.

$\beta$ ) Das gebundene Ammoniak kann man in einem aliquoten Teil des mit Magnesiumoxyd erhaltenen Destillates in gleicher Weise bestimmen.

Die gefundenen Ammoniakwerte addiert, geben die ganze vorhandene Ammoniakmenge an.

Den Ammoniakgehalt in Fabrikräumen kann man durch Durchleiten einer gemessenen Menge Luft durch 0,1 N.-Schwefelsäure und Zurückmessen mit 0,1 N.-Alkalilauge bestimmen.

## 2. Kaliumhydroxyd, Natriumhydroxyd und ihre Carbonate.

Die zerkleinerten Objekte werden innig gemischt und ein aliquoter Teil, wenn Hydroxyde vorliegen, mit Alkohol ausgezogen. In diesem Auszug wird die Lauge unter Tüpfeln mit Lackmuspapier solange mit 0,25 oder 0,1 N.-Säure versetzt, bis der Neutralpunkt erreicht ist. Aus dem Verbrauch an Säure kann man alsdann den Gesamtalkaligehalt berechnen.

Man kann auch die Alkalien, wie schon oben ausgeführt, durch Dialyse ausziehen, was bei Carbonaten stets durchgeführt werden muß, wozu man am besten die Dialysierhülsen von SCHLEICHER und SCHÜLL verwendet. Die Hülse mit dem zu untersuchenden Objekt hängt man in Wasser derart ein, daß die Außenflüssigkeitsmenge nicht zu groß ist und erneuert letztere alle 2 Stunden. Das Dialysat wird unmittelbar abgedampft. Am besten nimmt man die Dialyse unter einer Glasglocke vor, damit freie Alkalien nicht in Carbonate umgewandelt werden können.

Den Gehalt an Alkalicarbonat neben Hydroxyd kann man in der Weise bestimmen, daß man überschüssiges Bariumchlorid zusetzt, wodurch unlösliches Bariumcarbonat ausgeschieden wird und die äquivalente Menge Alkali-hydroxyd in Lösung geht. Man titriert in dem Filtrat wie oben das freie Alkali mit 0,25 oder 0,1 N.-Säure; ist die Lösung nur schwach gefärbt oder farblos, so kann man auch Methylrot als Indicator verwenden.

Zieht man die Kubikzentimeter der jetzt verbrauchten Säure von dem zuerst gefundenen Wert ab, so erhält man das an Kohlensäure gebundene Alkali.

## 3. Wasserglas.

Das gebräuchlichste Wasserglas ist Natronwasserglas = Natriummetasilicat ( $\text{SiO}_3\text{Na}_2$ ); auch Kaliwasserglas wird benutzt; sie sind in ungefähr 40%iger wäßriger Lösung im Handel.

Die wäßrigen Lösungen reagieren infolge hydrolytischer Spaltungen stark alkalisch. In den zu untersuchenden Objekten kann man das freie Alkali durch Titration bestimmen. Die Kieselsäure läßt sich in dem Abdampfrückstand in der Weise nachweisen, daß man den Rückstand in konz. Salzsäure aufnimmt und zur Trockene verdampft. Eine kleine Menge des Rückstandes an eine Phosphorsalzperle gebracht, muß ein Kieselsäureskelett geben. Weiterer Nachweis s. Kieselfluorwasserstoffsäure (S. 1427, Silicofluoride).

## 4. Kaliumsulfid, Ammoniumsulfid, Kaliumpolysulfid.

Die Sulfide bzw. Polysulfide reagieren alkalisch und verleihen den Objekten, Mageninhalt oder Erbrochenem, alkalische Reaktion. Auf Zusatz von Säuren entwickelt sich Schwefelwasserstoff, der geruchlich feststellbar ist und Bleiacetatspapier, das man in den Kolben hängt, in dem sich der wäßrige Auszug befindet, schwärzt. Eine schwache Reaktion ist nicht eindeutig; in faulenden Leichenteilen entwickelt sich auch Schwefelwasserstoff. Die alkalisch reagierende Lösung gibt auf Zusatz von Nitroprussidnatrium eine blauviolette Färbung.

# III. Freie Säuren und freie Halogene.

## 1. Kohlensäure ( $\text{CO}_2$ ).

Eine Vergiftung mit Kohlensäure kann durch den Nachweis von Kohlensäure in Organen nicht erbracht werden, da alle Gewebe Kohlensäure, das Endprodukt des Stoffwechsels, enthalten. Auch eine quantitative Bestimmung führt deshalb nicht zum Ziele.

Durch eine Bestimmung der Kohlensäure in Räumen können jedoch unter Umständen Schlüsse auf eine Kohlensäurevergiftung gezogen werden. Zu diesem Zwecke wird in den fraglichen Raum eine geeichte Flasche von etwa 5 Liter Inhalt gestellt, in welche man durch eine Blasevorrichtung die Luft des Raumes hineinpumpt. Es ist zu beachten, daß man längere Zeit die Luft durchbläst, damit sicher keine fremde Luft mehr in der Flasche sich befindet, alsdann setzt man eine gemessene, überschüssige Menge 0,05 N.-Barytlaug zu und schüttelt, nach aufgesetztem Gummistopfen, die Flasche längere Zeit durch. Nach der Gleichung  $\text{CO}_2 + \text{Ba}(\text{OH})_2 = \text{BaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$  findet die Abscheidung der Kohlensäure als Bariumcarbonat statt. Nach dem Umschütteln läßt man die Lösung klar absetzen, entnimmt mit einer Pipette einen aliquoten Teil und mißt unter Zusatz von Phenolphthalein die überschüssige Bariumhydroxydlösung mit 0,05 N.-Salzsäure zurück. 1 ccm 0,05 N.-Salzsäure = 1,1 mg Kohlensäure ( $\text{CO}_2$ ).

## 2. Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

Eine Vergiftung kann durch Einatmung schwefelwasserstoffhaltiger Luft hervorgerufen werden.

Chemisch läßt sich Schwefelwasserstoff dadurch nachweisen, daß man in das Gefäß, in dem sich die Leichenteile befinden, Bleiacetatpapier hineinhängt. Wird dieses braun bis schwarz gefärbt, so ist Schwefelwasserstoff vorhanden. Es darf jedoch der Inhalt des Gefäßes noch nicht in Fäulnis übergegangen sein.

Der Nachweis des Schwefelwasserstoffs im Blut auf spektroskopischem Wege ist ungenau. Der rote Blutfarbstoff ist in schmutzig-braun übergegangen, da nach dem Tode sich Sulfmethämoglobin bildet. Absorptionsspektrum s. S. 1433.

In der Luft kann man den Schwefelwasserstoff in der Weise nachweisen, daß man sie mittels eines Aspirators durch eine Waschflasche leitet, in der sich etwas ammoniakalisches Wasser befindet, das mit einigen Tropfen Nitroprussidnatriumlösung versetzt ist. Wird die Lösung violett gefärbt, so enthält die Luft Schwefelwasserstoff. Meist kann man auch schon durch Geruch in solchen Räumen Schwefelwasserstoff feststellen.

Die Bestimmung des Schwefelwasserstoffs kann in der Weise erfolgen, daß man vermittels einer Saugvorrichtung eine gemessene Menge Luft, etwa 10 Liter, durch eine gemessene Menge 0,01 N.-Jodlösung saugt, die sich in einer Kugelhöhle befindet. Da beim Durchsaugen aus der Jodlösung Jod entweicht, so legt man noch eine zweite Flasche, am besten eine Waschflasche, vor, in der sich eine gemessene Menge 0,01 N.-Natriumthiosulfatlösung befindet. Die eintretende Reaktion ist folgende:  $\text{H}_2\text{S} + 2 \text{J} = 2 \text{HJ} + \text{S}$ .

Hat man in die Gefäße gleiche Mengen 0,01 N.-Jodlösung bzw. Natriumthiosulfatlösung gegeben und nach dem Durchsaugen der Luft beide Lösungen quantitativ in einen Kolben gespült, so ist infolge der Bildung von Jodwasserstoffsäure durch Schwefelwasserstoff die Jodlösung schwächer geworden und ein Überschuß von Thiosulfatlösung vorhanden, den man unter Zusatz von Stärkelösung mit Jodlösung zurückmißt. Die hierzu verbrauchten Kubikzentimeter Jodlösung zeigen den Gehalt an Schwefelwasserstoff an. 1 ccm 0,01 N.-Jodlösung = 0,17 mg Schwefelwasserstoff ( $\text{SH}_2$ ). Sehr geringe Mengen Schwefelwasserstoff in Lösungen lassen sich auf colorimetrischem Wege bestimmen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> BEYTHIEN: Handbuch der Nahrungsmitteluntersuchung Bd. 1, 889.



### 3. Schweflige Säure (SO<sub>2</sub>).

In Organteilen ist Schweflige Säure nach einer Vergiftung nicht mehr nachweisbar, da sie infolge ihrer stark reduzierenden Wirkung sich schnell zersetzt. Auch im Mageninhalt wird es kaum gelingen, sie noch nachzuweisen. Da Schwefelsäure bzw. ihre Salze ein Bestandteil vieler Nahrungsstoffe ist, so wird man auch aus dem Gehalt an Schwefelsäure im Mageninhalt keine Schlüsse ziehen können.

Wenn das Blut jedoch braunrot gefärbt ist, so kann man aus dem vorhandenen Hämatinspektrum auf ein Reduktionsmittel schließen, zu denen auch die Schweflige Säure gehört. Spektrum s. S. 1431.

Luft, die Schweflige Säure enthält, charakterisiert sich durch ihren stechenden Geruch. Jodsäure-Stärkekleisterpapier wird durch Schweflige Säure blau gefärbt.

Quantitativ läßt sich Schweflige Säure, genau wie bei Schwefelwasserstoff erörtert, mittels Jodlösung bestimmen.  $2 J + SO_2 + 2 H_2O = SO_4H_2 + 2 HJ$ . 1 ccm 0,05 N.-Jodlösung = 1,6 mg Schweflige Säure (SO<sub>2</sub>).

Man kann auch die gebildete Schwefelsäure nach Vertreibung des Jods mit Bariumchlorid fällen und zur Wägung bringen.  $BaSO_4 \times 0,274 =$  Schweflige Säure (SO<sub>2</sub>).

### 4. Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Freie Schwefelsäure, namentlich wenn es sich um konz. Säure handelt, besitzt sehr starke Ätzwirkung unter Schwärzung des Gewebes. Der Nachweis braucht nicht näher beschrieben zu werden. Im Mageninhalt finden sich immer schwefelsaure Salze, die aus den Nahrungsmitteln stammen, vor. Es ist deshalb eine quantitative Bestimmung unerläßlich. Zu diesem Zweck kann man das Dialysat mit Kaliumhydroxyd neutralisieren, eindampfen, verkohlen und veraschen. In der mit Salzsäure schwach angesäuerten Lösung wird die Schwefelsäure mit Bariumchlorid gefällt und als Bariumsulfat zur Wägung gebracht. Vorher kann man die Gesamt-Acidität durch Titration mit N.-Lauge bestimmen.

### 5. Säuren des Stickstoffs.

Zu diesen zählen die Sauerstoff-Stickstoffverbindungen, das Stickoxyd (NO), Stickstofftrioxyd, Salpetrigsäureanhydrid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Stickstofftetroxyd (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) und die Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>). Von den freien Säuren ist nur die Salpetersäure beständig; sie zersetzt sich aber sehr leicht, wenn sie mit organischer Substanz in Berührung kommt. Es bilden sich braun gefärbte sog. nitrose Gase, zu denen Stickstofftrioxyd und Stickstofftetroxyd zählen. Das unbeständige Stickoxyd nimmt aus der Luft Sauerstoff auf und bildet damit die sog. nitrosen Gase, deren Ätzwirkung darauf beruht, daß sie mit dem Wassergehalt der Luft bzw. der Schleimhäute Säure bilden.

Infolge der schnellen Zersetzung sind diese Säuren bzw. die nitrosen Gase nach Einatmung in den Lungen nicht mehr nachweisbar. Zuweilen gelingt es aber, Methämoglobin nach Vergiftung mit nitrosen Gasen spektralanalytisch im Blut festzustellen. Man kann bei Erbrochenem versuchen, diese Gase nach dem Ansäuern mit Essigsäure überzudestillieren und das Destillat in Wasser aufzufangen und in diesem mittels angesäuertes Jodzink-Stärkelösung nachzuweisen. Bei Anwesenheit dieser Gase wird die Lösung durch ausgeschiedenes Jod blau gefärbt. Salpetersäure erkennt man bei Vergiftungen, wenn sie eingenommen wird, daran, daß die Speiseröhre und Schleimhäute des Magens verätzt sind und außerdem das Gewebe gelb gefärbt ist, Xanthoprotein-Bildung.

Weiteres s. unter Nitraten und Nitriten S. 1428.

## 6. Halogenwasserstoffsäuren.

Zu den Halogenwasserstoffsäuren zählen Chlor-, Brom-, Jod- und Fluorwasserstoffsäure. Diesen Säuren kommt eine allgemeine Ätzwirkung zu. Im Mageninhalt oder Erbrochenen kann die Säure direkt mit Phenolphthalein als Indicator titriert werden. Es ist jedoch zu beachten, daß der Mageninhalt infolge freier Salzsäure stets sauer ist..

Den Nachweis der Halogenwasserstoffverbindungen s. S. 1426.

## 7. Freie Halogene.

Bei Einatmung oder Einnahme der freien Halogene Chlor, Brom und Jod treten Zerstörungen des Gewebes auf. Es bilden sich mit den Eiweißkörpern halogenierte Verbindungen, die wahrscheinlich schnell zerfallen, wobei die Halogene in ihre Wasserstoffverbindungen übergeführt werden. Länger hält sich das Jod als solches im Mageninhalt und in den Geweben.

Nach VITALI weist man die Halogene sowohl im alkoholischen als auch im wäßrigen Auszug nach. Man zieht die zerkleinerten Objekte zunächst mit absol. Alkohol aus, wozu man am besten sich eines Perkolators bedient. Den alkoholischen Auszug unterwirft man der fraktionierten Destillation, fängt die übergehenden Halogenäthylverbindungen gesondert auf und prüft sie auf Anwesenheit von organisch gebundenem Halogen nach VITALI-TORNANI (S. 1292). Der Rückstand vom Alkoholauszug wird mit Wasser der Perkolation unterworfen, bis kein Halogen mehr in Lösung geht. Der nunmehr verbleibende Rückstand wird mit chlorfreier Natronlauge versetzt und verkohlt. Alsdann wird der kohlige Rückstand mit Wasser aufgenommen, die Lösung mit reiner Salpetersäure schwach angesäuert und auf dem Wasserbade zur Entfernung der gebildeten Blausäure erwärmt. In dem Filtrat wird alsdann das Halogen nach den bekannten Methoden nachzuweisen versucht.

Zu berücksichtigen ist das normale Vorkommen von Chlor und von Spuren Jod in organischer Bindung.

Bei Halogenvergiftungen ist der Harn vielfach tiefbraun gefärbt.

Bei Chlorvergiftungen kann man versuchen, im Lungengewebe, Blut und Gehirn nach der Methode von BINZ mit der Abänderung von GADAMER aus den zerkleinerten Objekten die sich bildende Unterchlorige Säure im Kohlensäurestrom überzudestillieren. Diese läßt sich geruchlich leicht erkennen. Auf Zusatz von mit Schwefelsäure angesäuerter Jodzink-StärkeLösung tritt bei Gegenwart von Unterchloriger Säure Blaufärbung ein.

Ebenso wie bei Chlorvergiftungen wird bei man bei Bromvergiftungen versuchen, den gebildeten Bromwasserstoff zu gewinnen und nach den eben beschriebenen Methoden nachzuweisen.

Da Brom im normalen Gewebe nicht vorkommt, so kann man Organteile mit Natriumcarbonat verkohlen, die Kohle mit Wasser ausziehen und nach Zusatz von Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaktion und Erwärmen zur Vertreibung der sich nebenbei bildenden Blausäure auf Bromwasserstoffsäure prüfen. Außer der Reaktion gegenüber Silbernitratlösung kann man noch durch vorsichtiges Zufügen von Chlorwasser Brom in Freiheit setzen, das sich in einigen Tropfen Chloroform beim Schütteln mit braunroter Färbung löst.

Eingeatmetes Jod hält sich längere Zeit in den Geweben; auch im Mageninhalt und Erbrochenen kann man vielfach noch freies Jod nachweisen.

Man leitet in der Wärme durch die zerkleinerten Leichenteile einen Luft- oder Kohlensäurestrom, der das Jod mit sich führt. Um es aufzufangen, schickt man das Gas durch zwei Waschflaschen, in denen sich Chloroform befindet. Ist Jod vorhanden, so färbt sich das Chloroform violett. Schüttelt man diese

Chloroformlösung mit Wasser, dem etwas Stärkekleister zugesetzt ist, kräftig durch, so wird die wäßrige Lösung blau gefärbt, fügt man alsdann Natriumthiosulfatlösung zu, so tritt Entfärbung ein.

Organteile, in denen kein freies Jod mehr nachweisbar ist, kann man wie beim Bromnachweis mit Natriumcarbonat veraschen und in der sauren Lösung die Jodwasserstoffsäure, wie oben beschrieben, mit Silbernitratlösung nachweisen.

## IV. Salze.

### A. Salze der Halogenwasserstoffsäuren und Chlorate.

#### 1. Alkalichloride.

Da die Kaliumsalze viel heftiger auf den Organismus wirken als die entsprechenden Natriumsalze, so ist es unbedingt erforderlich, neben dem Chlor auch das Alkalimetall, Kalium oder Natrium, quantitativ zu bestimmen.

Bestimmung von Kalium und Natrium. Man verfährt in der Weise, daß man das Objekt zur Trockene verdampft und verkohlt, den kohligen Rückstand mit Wasser auszieht und die wäßrige Lösung zur Entfernung der letzten Reste organischer Substanz vorsichtig nochmals nach dem Eintrocknen verkohlt. Die störenden Metalle, Eisen, Aluminium, Calcium, Magnesium sowie Phosphorsäure und Schwefelsäure müssen entfernt werden. Nach dem allgemeinen analytischen Gang fällt man durch Zusatz von Bariumchlorid die Schwefelsäure aus. Auf Zusatz von Chlorammonium und Ammoniumcarbonat werden die Erdalkalien, Eisen und Aluminium sowie die Phosphorsäure niedergeschlagen. Um die Magnesiumsalze quantitativ zu entfernen, dampft man das Filtrat zur Trockene, verjagt die Ammoniumsalze durch Glühen, nimmt den Rückstand mit Wasser und einigen Tropfen Salzsäure auf, fügt etwas Bariumhydroxydlösung bis zur stark alkalischen Reaktion zu, kocht die Lösung auf und filtriert vom Niederschlag ab. Um das überschüssige Bariumhydroxyd zu entfernen, wird die Lösung eingedampft, zur Entfernung der Ammoniumsalze sehr gelinde geglüht, mit Wasser und etwas Salzsäure aufgenommen, alsdann mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt und nach Zusatz von Ammoniumcarbonat auf 60—70° erwärmt und mit dem Filtrat die gleiche Operation wiederholt. In dem zweiten Filtrat befindet sich nun noch Natrium und Kalium. Man verdampft das Filtrat in einer gewogenen Platinschale zur Trockene, bevor alles Wasser verdampft ist, fügt man einige Tropfen Salzsäure zu und erwärmt den Rückstand mit bedecktem Uhrglas 2 Stunden bei 120—130°, glüht gelinde und wägt den Rückstand. Man erhält so die Summe der Chloride des Kaliums und Natriums. Der Rückstand wird in etwa 20 ccm Wasser gelöst und mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt. Zu der Lösung, die sich zweckmäßig in einer dunkel glasierten Porzellschale befindet, fügt man tropfenweise 5—10 ccm einer 20%igen Überchlorsäurelösung und nach dem Erkalten noch 15 ccm 96%igen Alkohol zu. Nach einigen Stunden filtriert man den vorher mit einem breitgedrückten Glasstab zerriebenen Niederschlag durch einen gewogenen Filtertiegel. Man gießt zuerst die Lösung ab und dekantiert den Niederschlag zweimal mit etwa 5 ccm einer Waschlösung, die aus 100 Teilen 96%igem Alkohol besteht, dem 0,2% Überchlorsäure zugesetzt sind. Nun bringt man den Niederschlag in den Tiegel und wäscht ihn mehrmals mit wenig 96%igem Alkohol aus. Das gesamte Filtrat darf nicht mehr als 75 ccm betragen. Den Tiegel trocknet man bei 120—130° und bringt ihn zur Wägung. Durch Subtraktion des dem Kaliumperchlorat entsprechenden Kaliumchlorids von den Gesamtchloriden erhält man den Gehalt an Natriumchlorid.

Ist die Kaliummenge gering, so liegt keine Vergiftung durch Kalisalze vor.

#### 2. Bromide, Jodide, Fluoride.

Neuerdings kommen häufiger Vergiftungen mit Silicofluoriden vor, da solche jetzt häufiger zur Schädlingsbekämpfung angewendet werden.

Die Salze dieser Säuren können mit Ausnahme der Silicofluoride aus den Objekten (Speisebrei oder Erbrochenem) durch Dialyse isoliert werden. Auch kann man die Säuren durch Alkohol den Objekten entziehen.

a) Bromide. Durch Silbernitrat wird in salpetersaurer Lösung hellgelbliches Silberbromid gefällt. Setzt man einer Bromsalzlösung vorsichtig Chlorwasser und etwas Chloroform zu und schüttelt nach jeweiligem Zusatz von Chlorwasser um, so tritt bei Gegenwart von Brom eine Braunfärbung des Chloroforms ein.

Handelt es sich um Mageninhalt, so muß man bedenken, daß die Chloride und die freie Salzsäure des Mageninhaltes die Reaktion auf Bromwasserstoff stören, wenigstens die Reaktion mit Silbernitrat.

b) **Jodide.** Durch Silbernitrat wird in salpetersaurer Lösung gelbes Jodsilber gefällt, das in Ammoniak unlöslich ist. Setzt man einer Jodlösung, wie bei Brom erwähnt, Chlorwasser zu, so wird das Chloroform violett gefärbt.

c) **Fluoride.** Um die löslichen Fluoride und Fluorwasserstoff nachzuweisen, wird die Lösung mit etwas Kalkbrei eingedampft und geglüht. Den Glührückstand bringt man in einen Platintiegel und bedeckt ihn mit der konkaven Seite eines Uhrglases, die mit einer Paraffinschicht überzogen ist, in welche Buchstaben eingekratzt sind. Zu dem Inhalt fügt man konz. Schwefelsäure. Nach Verlauf von einigen Stunden sind bei Anwesenheit von Fluoriden auf dem Uhrglas nach Entfernung des Paraffins Ätzungen, d. h. die Schriftzeichen, zu erkennen.

d) **Silicofluoride.** Das Fluor weist man in gleicher Weise nach wie bei den Fluoriden (s. oben). Zum Nachweis der Kieselsäure wird die Asche in einem Platin- oder Bleitiegel mit konz. Schwefelsäure versetzt. Das sich entwickelnde Gas, Siliciumfluorwasserstoffsäure, trübt einen an einen Glasstab gebrachten Tropfen Wasser, indem sich Metakieselsäure abscheidet. Nach SPAETH kann man die freie Kieselfluorwasserstoffsäure durch 50%igen Alkohol aus dem Untersuchungsobjekt ausziehen und nachweisen (s. auch S. 1422).

e) **Chlorate.** Bei Vergiftungen durch Chlorate wird man wohl nie solche im Magen- und Darminhalt finden, da die Resorption außerordentlich schnell verläuft. Man kann versuchen, durch Dialyse das Salz zu fassen. Der größte Teil des Chlorates wird mit dem Harn ausgeschieden. Das aus den Organteilen hergestellte Dialysat bzw. das isolierte Salz gibt mit verd. Schwefelsäure und wenigen Tropfen Indigolösung versetzt, erst auf vorsichtigen Zusatz von Schwefliger Säure eine Grünfärbung, die auf Zersetzung des blauen Indigofarbstoffes beruht, sofern Chlorate noch vorhanden sind, was jedoch meist nicht mehr der Fall ist. Fällt man aus dem Dialysat mit Silbernitrat alles Chlor als Chlorsilber aus, so muß in dem Filtrat bei Gegenwart von Chlorsäure auf Zusatz von Schwefliger Säure durch Reduktion von Chlorat zu Chlorid ein Niederschlag von weißem Chlorsilber erfolgen.

Die Bestimmung im Harn oder Dialysat kann vermittels der Zinkstaubdestillation durchgeführt werden: Die zu untersuchende Flüssigkeit wird in zwei gleiche Teile geteilt. In der einen Hälfte bestimmt man das Chlor, das stets als Chlorid vorhanden ist, durch Titration nach VOLHARD.

In dem zweiten Teil reduziert man die Chlorsäure mit Zink und verd. Schwefelsäure, indem man die Lösung  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade stehen läßt. Man filtriert vom Ungelösten ab, wäscht dieses aus und titriert wiederum nach VOLHARD. Die Differenz zwischen der ersten und zweiten Titration gibt den Gehalt an Chlor an, der auf Chlorsäure oder Chlorat berechnet wird. 1 Mol. Chlor = 1 Mol. Chlorsäure bzw. Kaliumchlorat.

## B. Borate, Nitrate und Nitrite.

### 1. Borate.

Liegen Salze der Borsäure vor, so ist die Reaktion der wäßrigen Objekte stark alkalisch. Zum Nachweis verdampft man den nötigenfalls alkalisch gemachten wäßrigen Auszug. Dem Rückstand kann man nach dem Ansäuern mit Salzsäure durch Alkohol die freie Borsäure entziehen.

Nachweis.  $\alpha$ ) Taucht man in die wäßrige, mit Salzsäure angesäuerte Lösung Curcumapapier und trocknet dieses, so tritt eine rote Färbung auf, die nach Betupfen mit Ammoniak schwarzblau wird.

β) Ein kleiner Teil der sauren Lösung eingedampft und in einem Porzellanschälchen mit etwas Methylalkohol versetzt, färbt beim Anzünden des Methylalkohols die Flamme grün.

Bestimmung. Die salzsaure wäßrige Lösung wird in einen Perforationsapparat gebracht und mit Äther extrahiert<sup>1</sup>. Nach dem Verdunsten des Äthers im Vakuum über Schwefelsäure kann das Extrahierte als Borsäure,  $B(OH)_3$ , zur Wägung gebracht werden. Um sicher zu gehen, daß keine anderen Stoffe mit extrahiert worden sind, wird der Rückstand im Kölbchen oder Wägegglas mit einigen Kubikzentimetern Methylalkohol versetzt und auf dem Wasserbade die Borsäure als Methylester verflüchtigt. Diese Behandlung wird bis zur Gewichtskonstanz wiederholt. Das nun gewogene Gefäß enthält jetzt die fixen Bestandteile, die von dem ursprünglichen Wert abgezogen werden müssen (s. auch S. 1267).

## 2. Nitrate.

Die Nitrate werden schnell resorbiert. Im Harn kann es gelingen, die Salpetersäure nachzuweisen. Der Harn wird eingeengt und mit wenig Wasser aufgenommen. Setzt man der Lösung den gleichen Raumteil konz. Schwefelsäure zu und überschichtet mit einer kaltgesättigten Ferrosulfatlösung, so bildet sich bei Gegenwart von Salpetersäure eine braune Zone von Stickoxyd, das sich mit brauner Farbe in der Ferrosulfatlösung löst.

Diese und andere in den toxikologischen Lehrbüchern beschriebenen Methoden versagen jedoch meist.

Man weist die Nitrate im Harn nach eigenen Versuchen am besten mit Nitron nach. Der Harn wird zunächst mit Tierkohle nach Möglichkeit entfärbt. Alsdann erhitzt man ihn zum Sieden, gibt einige Tropfen verd. Schwefelsäure und Nitronreagens (10%ige Lösung von Nitron in 5%iger Essigsäure) zu und läßt unter Umständen 24 Stunden lang stehen. Ist mehr Nitrat zugegen, so erfolgt alsbald eine krystalline Ausscheidung, sonst erst nach längerer Zeit. Es scheiden sich häufiger mit dem Nitronnitrat auch noch Harnsäure und andere Salze aus. Aus diesem Grunde ist es erforderlich, in der ausgeschiedenen Masse, die man auf einem kleinen Nutschfilterchen sammeln und auswaschen kann, noch die Salpetersäure nachzuweisen. Man nimmt einige Kryställchen, gibt sie in ein Reagensglas und fügt etwa 1 cem Wasser hinzu. Alsdann unterschichtet man mit Diphenylaminschwefelsäure. An der Berührungsstelle und an den an dieser Stelle befindlichen Kryställchen tritt eine positive Reaktion, Blaufärbung, auf. Liegen größere Ausscheidungsmengen vor, so kann man durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser das Nitronnitrat reinigen. Es können so noch 0,5 mg Salpetersäure ( $N_2O_5$ ) bzw. salpetersaure Salze nachgewiesen werden (s. auch S. 650).

## 3. Nitrite.

Nitrite können bei Einnahme von Salpeter durch Reduktion im Organismus entstehen. Man stellt ein Dialysat des Mageninhaltes oder Erbrochenen her und destilliert es unter Zusatz von Essigsäure. Setzt man zu einem Teil des Destillates verd. Schwefelsäure und Jodzink-Stärkelösung, so wird die Lösung gebläut. Versetzt man die Lösung mit einigen Tropfen verd. Schwefelsäure und alsdann mit kalt gesättigter Sulfanilsäurelösung und mit  $\alpha$ -Naphthylamin, das in 50%iger Essigsäure gelöst ist, so entsteht eine rote Färbung, bei größerer Menge eine gelbe Färbung. Liegen größere Mengen Nitrit vor, so bildet sich ein roter Niederschlag von Azobenzol-naphthylamin-sulfosäure (s. auch S. 660).

In dem Blute kann man Methämoglobin nach S. 1431 nachweisen.

<sup>1</sup> A. PARTHEIL u. J. ROSE: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1901, **34**, 3611; **Z.** 1902, **5**, 1049.

## V. Kohlenoxyd (CO).

Kohlenoxyd ist das unvollkommene Verbrennungsprodukt der organischen Verbindungen; so bildet es sich beim Verbrennen der Kohle im Ofen, wenn nicht genügend Luftzufuhr vorhanden ist. Leuchtgas enthält rund 4–10%, Wassergas über 40% und Gichtgase 24% Kohlenoxyd.

Das Kohlenoxyd ist ein farbloses und geruchloses Gas. Nach dem Einatmen von Kohlenoxyd bildet sich im Blut Kohlenoxydhämoglobin. Charakteristisch ist, daß das Blut eine hellrote Farbe durch das gebildete Kohlenoxydhämoglobin annimmt. Ein Schütteln des Blutes mit Luft ist zu vermeiden, da das Kohlenoxyd wieder von den roten Blutkörperchen abgegeben wird.

### a) Nachweis.

Chemischer Nachweis im Blut.  $\alpha$ ) Methode von HOPPE-SEYLER: Versetzt man eine etwa 20fach verdünnte Blutlösung mit dem gleichen Volum 30%iger Natronlauge, so entsteht zuerst eine weißliche Trübung und alsdann eine hellrote Färbung. Normales Blut wird schmutzig braungrün gefärbt.

$\beta$ ) Methode von SALKOWSKI. Zu der wie oben verdünnten Blutlösung setzt man etwa die Hälfte des Volums gesättigten Schwefelwasserstoffwassers zu. Es tritt keine Farbänderung ein, die Farbe ist hellrot. Normales Blut wird schmutzig dunkelgrün gefärbt.

$\gamma$ ) Methode von RUBNER. Wird das Blut mit dem ein- bis fünffachen Volum Bleiessig 1 Minute geschüttelt, so färbt sich Kohlenoxydblut schön rot. Normales Blut nimmt eine bräunliche Färbung an.

$\delta$ ) Methode von KUNKEL. Wird 1 Volum Blut mit 4 Volum Wasser verdünnt, setzt man zu dieser Mischung die dreifache Menge 3%iger Tanninlösung zu und schüttelt kräftig durch, so färbt sich die Flüssigkeit rot. Normales Blut wird graubraun gefärbt.

$\epsilon$ ) Methode von WETZEL. Versetzt man unverdünntes Blut mit dem gleichen Volum 20%iger Ferrocyankaliumlösung und auf 20 ccm Mischung 2 ccm Essigsäure (1 Tl. Eisessig und 2 Tle. Wasser), so tritt eine Carmoisinrotfärbung nach einigen Stunden auf, die nach 24 Stunden die höchste Rotfärbung erreicht hat. Normales Blut wird grau gefärbt. Nach den Methoden  $\alpha$ ),  $\delta$ ) und  $\epsilon$ ) lassen sich noch 10% Kohlenoxyd im Blut nachweisen.

$\zeta$ ) Methode von LIEBMANN. Setzt man zu einer verdünnten Blutlösung Formaldehydlösung, so bleibt die rote Farbe bestehen. Normales Blut wird schmutzibraun gefärbt.

Spektroskopischer Nachweis im Blut. Die verdünnte, klar filtrierte Blutlösung wird in eine Küvette gefüllt und vor den Spalt des Spektralapparates gestellt. Ist die Blutlösung genügend stark verdünnt, so sieht man 2 Absorptionsstreifen, die denen des Oxyhämoglobins sehr ähnlich sind. Es ist jedoch der bei *D*, also im Gelben, liegende Absorptionsstreifen etwas nach *E* verschoben, wenn es sich um kohlenoxydhaltiges Blut handelt. Der Gehalt an Kohlenoxyd muß über 26,5% betragen, da sonst das noch vorhandene Oxyhämoglobin die Verschiebung des Absorptionsstreifens des kohlenoxydhaltigen Blutes verdeckt. Jedoch können geringere Gehalte an Kohlenoxydhämoglobin noch dadurch nachgewiesen werden, daß man 2 Tropfen Schwefelammoniumlösung zu der fraglichen Blutlösung in die Küvette bringt. Liegt reines Blut vor, so tritt das Spektrum des Hämoglobins auf, nämlich ein breites diffuses Absorptionsband zwischen *D* und *E*. Enthält das Blut Kohlenoxyd, so bleiben die beiden Absorptionsbänder des Kohlenoxydhämoglobins zwischen *D* und *E* bestehen, wenn sich auch zwischen ihnen das diffuse Band des Hämoglobins noch zeigt, wie es meist der Fall ist. Es ist ratsam, stets Vergleiche mit reinem Blut anzustellen.

Eine quantitative Bestimmung des Kohlenoxydgehaltes im Blute erübrigt sich vielfach, da man doch wohl nie die ursprüngliche Menge an Kohlenoxyd wieder findet und man aus dem qualitativen Nachweis meist ersehen kann, ob viel Kohlenoxyd vom Blut aufgenommen worden ist. Annähernd kann man auf spektralanalytischem Wege den Kohlenoxydgehalt nach WELZEL in der Weise bestimmen, daß man dem in der Küvette befindlichen Blut soviel normales Blut zusetzt, bis nach der Reduktion mit Schwefelammoniumlösung die beiden Absorptionsstreifen bei *D* und *E* verschwunden sind und nur das diffuse Band des Hämoglobins zwischen *D* und *E* zu sehen ist. Da nun Blut mit nicht über 26,5% Kohlenoxyd sich gegenüber Reduktionsmitteln wie normales Blut verhält, so kann man aus der Zusatzmenge normalen Blutes annähernd den Gehalt an Kohlenoxyd berechnen. Berücksichtigt werden muß der Verdünnungsgrad der beiden Blutproben.

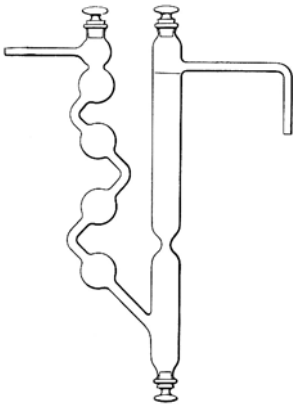


Abb. 21. Absorptionsgefäß.  
(Nach WOLFF.)

Tritt jedoch Schwärzung des Papiers ein, so kann diese auch durch Ammoniak, Schwefelwasserstoff und durch andere organische Stoffe hervorgerufen sein. Um Ammoniak und Schwefelwasserstoff auszuschalten, kann man auch so verfahren, daß man ein bestimmtes Luftquantum zuerst durch verd. Schwefelsäure und Bleiacetatlösung und dann durch einen Kugelapparat leitet, in dem sich Palladiumchlorürlösung befindet. Wenn die Luft Kohlenoxyd enthält, so scheidet sich metallisches Palladium aus. Auch dieser Methode haften noch Mängel an.

C. H. WOLFF<sup>2</sup> leitet Luft durch einen besonderen Absorptionsapparat (Abb. 21), in dem 2 ccm verdünntes Blut 1:40, auf Glaspulver sich befindet. Die Blutflüssigkeit wird alsdann, wenn etwa 10–20 Liter Luft durchgeleitet sind, spektralanalytisch, wie oben beschrieben, auf Kohlenoxydhämoglobin geprüft.

Diese Methode ist von HEMPEL in der Weise verfeinert worden, daß er die Luft durch ein Gefäß leitete, in der sich eine lebende Maus befand. Nach Durchsaugen von etwa 30 oder 40 Liter Luft innerhalb 3–4 Stunden tötet man die Maus und entnimmt ihr das Herzblut, das spektralanalytisch alsdann auf Kohlenoxydhämoglobin geprüft wird. Es können so noch 0,032% Kohlenoxyd nachgewiesen werden.

Nach W. M. PILAAR<sup>1</sup> bestimmt man das Kohlenoxyd im Blut nach einer Mikromethode, die im Prinzip der Methode von L. P. KINNIENT und G. R. SANDFORT, S. 1431, entspricht.

Nachweis von Kohlenoxyd in der Luft.

Um in Räumen Kohlenoxyd nachzuweisen, verfährt man nach HEMPEL in der Weise, daß man eine 10 Liter-Flasche mit Wasser füllt und in dem Raum, in dem Kohlenoxyd nachgewiesen werden soll, entleert. Die Flasche verschließt man mit einem Korken, an dessen untere Seite ein Platindraht hineingesteckt ist, an dem ein mit verdünnter neutraler Palladiumchlorürlösung getränkter Filtrierpapierstreifen befestigt ist. Etwas Wasser muß in der Flasche zurückbleiben, damit der Filtrierpapierstreifen feucht bleibt.

Tritt nach 24 Stunden keine Schwärzung des Papiers ein, so enthielt die Luft kein Kohlenoxyd.

<sup>1</sup> W. M. PILAAR: Chem. Weekbl. 1928, 25, 509; Z. 1933, 65, 589.

<sup>2</sup> C. H. WOLFF: Korresp.-Blatt d. Vereins analyt. Chem. 1880.

## b) Bestimmung.

Bestimmung des Kohlenoxydgehaltes der Luft. Nach L. P. KINNICUT und G. R. SANDFORD<sup>1</sup> in von FROBOESE abgeänderter Form leitet man eine bestimmte Menge Luft über Jodsäureanhydrid, es tritt eine Oxydation des Kohlenoxyds zu Kohlensäure unter Freiwerdung von Jod ein.  $J_2O_5 + 5 CO = 5 CO_2 + 2 J$ . Man leitet zunächst durch Watte filtrierte und durch Waschen mit Schwefelsäure und Kalilauge gereinigte Luft, die frei von Kohlenoxyd und Kohlensäure ist, während einer Stunde über 20 g Jodsäureanhydrid, das sich in einem U-Rohr befindet, welches in einem Ölbad auf 100° erhitzt wird. Dann saugt man die gemessene fragliche Luft und zuletzt noch einmal wie am Anfang gereinigte Luft durch den Apparat. Die gebildete Kohlensäure leitet man in titriertes Barytwasser ein und mißt den Überschuß des Barytwassers mit Oxalsäurelösung von bestimmtem Gehalt zurück. 1 Mol.  $CO_2 = 1$  Mol. CO.

## Spektroskopische Untersuchung von Blut, das durch Gifte verändert wurde.

Bereits bei Blutgiften, Anilin, Nitrobenzol, Chloraten usw. wurde auf die spektroskopische Veränderung des Blutes durch dieses oder jenes Gift hingewiesen.

Da bei Vergiftungen meist eine genügende Menge Blut zur Verfügung steht, so kann man die verschiedensten Spektrographen benutzen.

Durch Metallspektren fixiert man verschiedene Wellenlängen, die für die Blutuntersuchung von Wichtigkeit sind, Näheres s. Spektroskopie (S. 298).

Zur Beobachtung der Spektren werden die zu untersuchenden Blutlösungen klar filtriert und genügend mit Wasser verdünnt, in planparallele Küvetten von etwa 2—3 ccm Fassungsvermögen gefüllt. Sind die Absorptionsbänder zu dunkel, so wird die Blutlösung stärker verdünnt. Man muß z. B. bei normalem Blut so stark verdünnen, daß man in Gelb und Grün zwischen den Linien *D* und *E* zwei Absorptionsbänder sieht, die denen des Oxyhämoglobins entsprechen. Setzt man jetzt ein Reduktionsmittel, z. B. ein Tröpfchen Schwefelammoniumlösung, hinzu, so verändert sich das Spektrum des Blutes in der Küvette. Man erhält zwischen den Linien *D* und *E* ein diffuses Band, das dem Spektrum des Hämoglobins entspricht.

Schon äußerlich kann man gewisse Blutgifte an der Färbung des Blutes selbst erkennen. Bei Blausäurevergiftungen ist das Blut hellrot und bei Kohlenoxydvergiftungen kirschrot gefärbt. Der Nachweis von Kohlenoxyd im Blut ist auf S. 1429 näher beschrieben.

Bei Vergiftungen mit Anilin und Nitrobenzol, Chloraten usw. nimmt das Blut eine schokoladenbraune Färbung an. Man kann das Spektrum des Methämoglobins in saurer oder alkalischer Lösung feststellen, siehe S. 1432. Um sicher zu gehen, reduziert man dieses Blut mit Schwefelammonium und muß alsdann das Hämoglobinspektrum erhalten. Dieses ist wichtig, um eine Verwechslung mit dem Hämatinspektrum zu vermeiden. Der Nachweis des Methämoglobins hat nur Wert, wenn das Blut von noch lebenden Personen stammt, da in Leichen sich Methämoglobin bildet.

Durch Vergiftung mit Schwefliger Säure findet eine weitgehende Zersetzung des Blutes statt. Man findet in solchen Fällen in saurer oder alkalischer Lösung das charakteristische Hämatinspektrum. Häufiger sieht man daneben auch noch das Häminspektrum.

<sup>1</sup> L. P. KINNICUT u. G. R. SANDFORD: Journ. Amer. Chem. Soc. 1900, 22, 14.



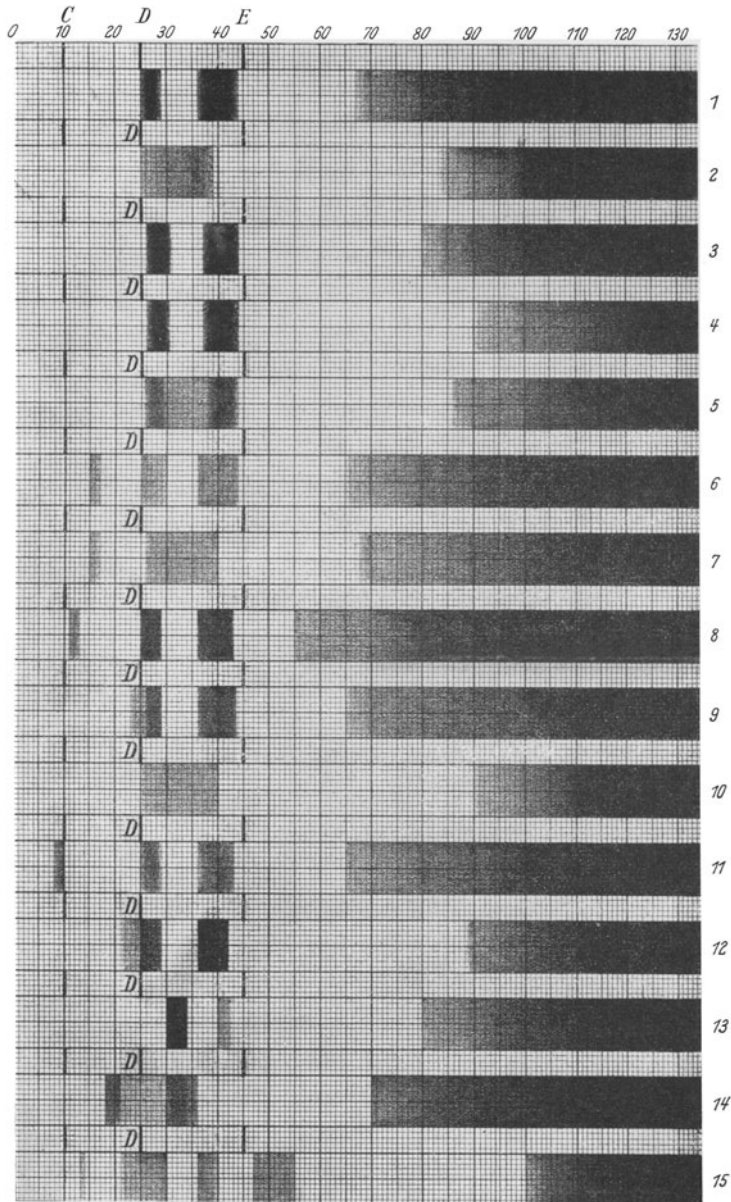


Abb. 22. Blutspektren nach LEWIN.

- |   |   |
|---|---|
| 1 Oxyhämoglobin.  | 8 Methämoglobin.                          |
| 2 Hämoglobin.   | 9 Alkalisches Methämoglobin.              |
| 3 Kohlenoxydhämoglobin.   | 10 Methämoglobin nach der Reduktion.      |
| 4 Kohlenoxydhämoglobin mit Reduktionsmitteln.                       | 11 Hämatin in saurer Lösung.              |
| 5 Kohlenoxydhämoglobin (+ Sauerstoffhämoglobin nach der Reduktion). | 12 Hämatin in alkalischer Lösung.         |
| 6 Sulfhämoglobin (+ Oxyhämoglobin).                                 | 13 Reduziertes Hämatin (Hämochromogen).   |
| 7 Sulfhämoglobin (+ Hämoglobin).                                    | 14 Hämatoporphyrin in saurer Lösung.      |
|   | 15 Hämatoporphyrin in alkalischer Lösung. |

Liegen Vergiftungen mit Morphin, Sulfonal oder chronische Bleivergiftung vor, so tritt das Hämatoporphyrinspektrum auf, das auch in sauren oder alkalischen Lösungen verschiedene Absorptionsbänder zeigt.

Schwer ist es, bei Vergiftungen mit Schwefelwasserstoff das Spektrum des Sulfhämoglobins zu erkennen. Zum Nachweis soll sich besonders das Gehirnblut eignen. Für das Sulfhämoglobinspektrum ist das zwischen *C* und *D* liegende Absorptionsband charakteristisch (Abb. 22).

## Anhang.

### Reinigung und Prüfung der Reagenzien.

#### 1. Allgemeine Alkaloidreagenzien.

Platinchloridchlorwasserstoffsäure. Auflösung von Platinchlorid 1:25 in Wasser.  
Goldchloridchlorwasserstoffsäure. Auflösung von Goldchlorid 1:25 in Wasser.

Quecksilberchlorid. Auflösung von Quecksilberchlorid 1:20 in Wasser.

Jodjodkaliumlösung. 5 g Jod und 12 g Jodkalium werden in wenig Wasser gelöst und auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt.

Wismutjodidjodkalium. 80 g Wismutsubnitrat werden in 200 ccm Salpetersäure (Spez. Gewicht 1,18) gelöst und diese Lösung in eine konz. Jodkaliumlösung (272 g Jodkalium in wenig Wasser gelöst) eingegossen. Nachdem der Salpeter auskristallisiert ist, gießt man nach einigen Tagen die Lösung ab und verdünnt sie mit Wasser auf 1 l.

Cadmiumjodid-Jodkalium. 20 g Jodkalium werden in der gleichen Menge heißen Wassers gelöst und 10 g Cadmiumjodid zugefügt, alsdann wird die Lösung mit Wasser auf 100 ccm verdünnt.

Quecksilberjodid-Jodkalium. 1,35 g Quecksilberchlorid und 5 g Jodkalium werden in 100 ccm Wasser gelöst.

Phosphormolybdänsäure (SONNENSCHEIN'S Reagens): Ammoniumphosphormolybdat wird in wenig Natriumcarbonatlösung gelöst. Die Lösung dampft man auf dem Wasserbad zur Trockne ein und glüht solange, bis kein Ammoniak mehr entweicht. Den Rückstand löst man in der 10fachen Menge Wasser und versetzt solange mit Salpetersäure, bis ein zunächst entstehender Niederschlag sich wieder gelöst hat.

Phosphorwolframsäure (Reagens nach SCHEIBLER). 1 Tl. Natriumwolframat wird in 3 Tln. Wasser gelöst und mit  $\frac{1}{2}$  Tl. 25%iger Phosphorsäure versetzt.

Tanninlösung. Frisch bereitete 5%ige Tanninlösung.

Pikrinsäurelösung. Eine gesättigte, wäßrige Pikrinsäurelösung.

Pikrolensäure. Alkoholische 0,1 N.-Pikrolensäurelösung, 2,64 g in 100 ccm Wasser gelöst.

#### 2. Spezielle Alkaloidreagenzien.

Reine konz. Schwefelsäure.

Konz. Salpetersäure.

Arsen-Schwefelsäure (Reagens von ROSENTHALER und TÜRK). 1 g zerriebenes Kaliumarsenat wird in 100 ccm konz. Schwefelsäure gelöst.

ERDMANN'S Reagens. 20 ccm reine, konz. Schwefelsäure werden mit 10 Tropfen einer Mischung, die aus 10 Tropfen konz. Salpetersäure und 100 ccm Wasser besteht, versetzt.

MANDELIN'S Reagens. 1 g fein zerriebenes Ammoniumvanadat wird kalt in 200 g konz. Schwefelsäure gelöst.

FRÖHDE'S Reagens. 1 g Ammoniummolybdat wird durch Schütteln mit 100 ccm konz. Schwefelsäure in Lösung gebracht. Die Lösung ist nur beschränkt haltbar.

MECKE'S Reagens. 1 g Selenige Säure wird in 200 ccm konz. Schwefelsäure gelöst.

MARQUIS' Reagens. 2—3 Tropfen einer 40%igen Formaldehydlösung werden in 3 ccm konz. Schwefelsäure gelöst.

#### 3. Spezialreagenzien auf Gifte und stark wirkende Arzneimittel,

soweit im Text ihre Zusammensetzung nicht beschrieben ist.

DENIGÈS' Reagens. Eine Lösung von 5 g gelbem Quecksilberoxyd in einer Mischung aus 20 ccm Schwefelsäure in 100 ccm Wasser.

Diazo-Reagens. Lösung I 0,5% Sulfanilsäure, 5 g Salzsäure in 100 ccm Wasser. — Lösung II 0,5% Natriumtrinitritlösung. — Zum Gebrauch sind 10 ccm der Lösung I mit 2 Tropfen der Lösung II frisch zu mischen.

FEHLINGSche Lösung. Lösung I 34,64 g Kupfersulfat zu 500 ccm Wasser. — Lösung II 173,0 g Seignettesalz, 50 g Ätznatron zu 500 ccm Wasser. — Für den Gebrauch sind beide Lösungen zu gleichen Teilen zu mischen.

Fuchsinbisulfidlösung nach DENIGÈS. Zu einer Lösung von 1 g Fuchsin in 1 l Wasser setzt man 50 ccm gesättigte Natriumsulfidlösung hinzu und säuert mit 1 ccm konz. Schwefelsäure an.

GÜNZBURGS Reagens. Eine Lösung von je 1 Tl. Phloroglucin und Vanillin in 30 Tln. Alkohol.

Jodeosin. 1:500 Alkohol. 2 Tropfen 0,01 N.-Lauge bzw. Säure müssen beim Umschütteln mit neutralem Äther einen Farbenschlag geben.

Jodzink-Stärkelösung. 4 g lösliche Stärke werden mit Wasser angerieben, in einem dünnen Strahl in eine kochende Lösung von 20 g Zinkchlorid in 100 Tln. Wasser eingegossen und  $\frac{1}{2}$  Stunde unter Ersatz des verdampfenden Wassers gekocht. Nach dem Erkalten und Absetzen wird eine Jodzinklösung (1 g Zink, 2 g Jod in 10 g Wasser durch Erwärmen gelöst) zugegeben und auf 1 l aufgefüllt. — Verd. Schwefelsäure darf keine Blaufärbung hervorrufen; mit 1 Tropfen 0,1 N.-Jodlösung auf 5 ccm Lösung muß Blaufärbung entstehen.

MILLONS Reagens. 1 Tl. Quecksilber wird kalt in 1 Tl. rauchender Salpetersäure gelöst und mit 2 Tln. Wasser verdünnt.

NESSLERS Reagens. Zu einer Lösung von 2 g Jodkalium in 5 ccm Wasser gibt man soviel Quecksilberjodid, bis sich nichts mehr löst, setzt dann eine Lösung von 13,4 g Kalihydrat in 46,6 ccm Wasser hinzu, läßt absitzen und filtriert durch Asbest.

Morphin-Schwefelsäure (JORRISENS Reagens). Eine Lösung von 0,2 g Morphinchlorhydrat in 10 ccm reiner, konz. Schwefelsäure. Jeweils frisch zu bereiten, da die Lösung nicht haltbar ist.

Perhydrol-Schwefelsäure. Eine Mischung von 1 Vol. 30% Perhydrol MERCK mit 10 Vol.-% konz. Schwefelsäure.

Phloroglucin-Reagens. Eine Lösung von 1 g Phloroglucin in 100 ccm 10%iger Natronlauge. Dieses Reagens auf Formaldehyd ist stets frisch zu bereiten.

Urannitrat-Reagens (Reagens auf Morphin und Phenole). Einer Lösung von 10 g Uranyl nitrat oder -acetat in 60 ccm Wasser setzt man verd. Ammoniak bis zur beginnenden Trübung zu, filtriert und verdünnt mit Wasser bis auf 100 ccm.

Zinnchlorürlösung (BETTENDORFFS Reagens). In eine Anreibung von 5 Tln. kristallisiertes Zinnchlorür mit 1 Tl. Salzsäure wird trockenes Chlorwasserstoffgas bis zur Sättigung eingeleitet und die Lösung nach dem Absetzen durch Asbest filtriert.

#### 4. Anorganische Reagenzien, die einer besonderen Prüfung und Reinigung bedürfen.

Ammoniak. Ammoniak, das dem Deutschen Arzneibuch entspricht, wird unter Zusatz von etwas Permanganat destilliert. Das entweichende Ammoniakgas wird durch eine Waschflasche mit starker Natronlauge geleitet und in reinem destilliertem Wasser aufgefangen. Da dieses Ammoniakwasser noch immer Spuren Arsen enthalten kann, wird es mit frisch gefälltem, gut ausgewaschenem Eisen- oder Aluminiumhydroxyd längere Zeit kräftig geschüttelt und nach etwa 1 Stunde abfiltriert.

Prüfung. 1. Auf Arsen: 100 ccm der Ammoniaklösung werden mit überschüssiger Permanganatlösung versetzt und zur Trockene abgedampft. Den Rückstand nimmt man mit verd. Schwefelsäure auf und prüft nach MARSH (Modifikation nach LOCKEMANN).

2. Auf Schwefelwasserstoff. Ammoniakalische Bleiacetatlösung darf durch die Ammoniaklösung nicht gefärbt werden.

3. Auf organische Basen. Man schüttelt die Ammoniaklösung mit Äther aus. Der Äther wird mittels entwässertem Natriumsulfat getrocknet und durch Durchblasen von Luft die Spuren gelösten Ammoniaks entfernt. Alsdann fügt man im Scheidetrichter etwa 10 ccm Wasser zu und säuert das Ganze schwach mit Salzsäure an. Die wäßrige salzsaure Lösung wird auf einem Uhrglas eingedampft und mit einigen Tropfen Wasser aufgenommen. Nach Zusatz von einigen Tropfen eines allgemeinen Alkaloidreagenzes, z. B. Wismutjodid-Jodkalium, darf keine Fällung eintreten.

Ammoniumcarbonat. Es wird eine gesättigte Lösung von Ammoniumcarbonat in schwach ammoniakalischem Wasser hergestellt. Die Prüfung ist die gleiche wie bei Ammoniak angegeben.

Chlorsäure. Zur Anwendung gelangt eine 32%ige Lösung. Sie muß frei sein von Arsen, Metallen und alkalischen Erden. Zur Prüfung auf Reinheit werden etwa 20 g Chlorsäure langsam in 100 ccm arsenfreier Salzsäure eingetragen. Alsdann dampft man in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockene, nimmt den Rückstand mit verd. arsenfreier Schwefelsäure auf und prüft wie bei Ammoniak auf Arsen.

**Jodkalium.** Es muß arsenfrei sein. Die Prüfung auf Arsen kann wie bei Ammoniak erfolgen. Ferner darf Jodkalium kein Jodat enthalten. Ein Zusatz von Säure würde eine Blaufärbung von Stärkelösung hervorrufen.

**Kaliumchlorat.** Es darf keine Schwermetalle, alkalische Erden und Arsen enthalten. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff darf keine Trübung, auch nicht nach Zusatz von Ammoniak, eintreten. Ammoniumoxalatlösung darf ebenfalls keine Trübung hervorrufen. Auf Arsen prüft man wie bei Chlorsäure unter Verwendung von 20 g.

**Kaliumhydroxyd.** Es darf Metalle, Arsen, alkalische Erden und Ammoniak nicht enthalten. Schwefelammonium- und Ammoniumoxalatlösung dürfen keine Trübung hervorrufen. Auf Arsen wird nach dem Neutralisieren mit Schwefelsäure wie bei Ammoniak geprüft.

**Kaliumcarbonat.** Es muß frei von Metallen, Arsen, Schwefelverbindungen und Cyan sein. Die mit Säure neutralisierte Lösung darf auf Zusatz von Ammoniumsulfidlösung nicht getrübt werden. Arsen weist man nach der Neutralisation mit Säure wie bei Ammoniak nach. Auf Cyanverbindungen prüft man in der Weise, daß man zu der mit etwas Natronlauge versetzten wäßrigen Lösung eine Spur Eisenchlorid und Ferrosulfat zusetzt und schwach erwärmt; nach Zusatz von überschüssiger Salzsäure darf keine Grünfärbung auftreten.

**Kaliumnitrat.** Da es zuweilen Spuren Arsen enthält, kann man das schon durch Umkrystallisation gereinigte Salz von Spuren Arsen in der Weise befreien, daß man sich eine fast gesättigte Lösung von Kaliumnitrat bei 0° herstellt und mit 10 ccm einer durch mehrmaliges Umkrystallisieren gereinigten Eisenaunlösung versetzt, die im Liter 225 g Eisenaun enthält. Der durch Eis gekühlten Lösung setzt man 3 ccm einer 2,4%igen Ammoniaklösung hinzu, läßt nach dem Umrühren 15 Minuten stehen und fügt noch weitere 7 ccm Ammoniaklösung hinzu, rührt um und filtriert das ausgeschiedene Eisen nach 15 Minuten ab. Die nach dem Abdampfen zurückbleibenden Krystalle sind nun völlig arsenfrei und werden von der Mutterlauge getrennt. Die Prüfung auf Arsen wird in der Weise ausgeführt, daß man etwa 10–15 g mit reiner Schwefelsäure abraucht und wie bei Ammoniak weiter verfährt. Einige Tropfen verd. Schwefelsäure zu einer Lösung 1:20 zugesetzt, dürfen nach vorheriger Zugabe von 1 ccm Jodzink-Stärkelösung eine Blaufärbung nicht hervorrufen (Jodate).

Natriumcarbonat ist zu prüfen wie Kaliumcarbonat.

Natriumchlorid muß frei sein von Arsen, Metallen und alkalischen Erden. Prüfung auf Arsen in schwefelsaurer Lösung wie bei Ammoniak.

Natriumnitrat ist zu prüfen wie Kaliumnitrat.

**Salpetersäure.** Sie findet Anwendung als verdünnte, konzentrierte und rauchende Säure. Im Handel ist arsenfreie Salpetersäure zu erhalten, deren Reinheitsgrad genügt. Rein kann man die Säure herstellen durch Destillation von reinem Salpeter mit reiner, d. h. arsenfreier Schwefelsäure. Die Prüfung auf Arsen erfolgt wie bei Kaliumnitrat. Die Salpetersäure darf ferner nach dem Abstumpfen mit Ammoniak in verd. Lösung durch Schwefelwasserstoff nicht verändert werden (Metalle). Die Säure ist in Porzellanflaschen aufzuheben.

**Salzsäure.** Die Säure wird als verdünnte und rauchende Salzsäure benutzt. Metallsalze werden durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in die durch Ammoniak fast neutralisierte Lösung nachgewiesen. Auf Arsen wird nach MARSH, LOCKEMANN oder BECK und MERRES geprüft. Da man beim Zerstören der organischen Substanz viel Salzsäure benötigt, so ist auf ihre Arsenfreiheit besonders zu achten. Es sind deshalb etwa 500 ccm der konz. Salzsäure nach Zusatz von aus Blumendraht hergestellter Eisenchloridlösung der Destillation zu unterwerfen. Die zuerst übergehenden 30% der Säure werden nach LOCKEMANN oder BECK und MERRES auf Arsen geprüft. Die reine Säure ist zweckmäßig in Porzellanflaschen aufzuheben. — Arsenfreie Salzsäure läßt sich am besten aus arsenfreiem Natriumchlorid und arsenfreier Schwefelsäure herstellen, indem man die Salzsäure aus einer Retorte (Jenaer Glas) abdestilliert. Das reine Natriumchlorid läßt sich nach der Eisenfällungsmethode, wie beim Ammoniak, von Spuren Arsen befreien.

Schwefelammonium wird rein durch Einleiten von arsenfreiem Schwefelwasserstoff in reines Ammoniak hergestellt.

**Schwefelsäure.** Für die meisten Zwecke genügt die heute als „arsenfrei“ bezeichnete Schwefelsäure des Handels. Nach LOCKEMANN<sup>1</sup> läßt sich völlig arsenfreie Schwefelsäure durch Durchleiten von Salzsäuregas durch erhitzte konz. Schwefelsäure herstellen. Eine Porzellanflasche von etwa 1 l Fassungsvermögen wird in ein Sandbad gesetzt, so daß der Sand ringsherum fast die Höhe der Flasche erreicht. Wenn ein in den Sand gestecktes Thermometer 150° anzeigt, leitet man Chlorwasserstoff durch den Inhalt der Flasche bis die Temperatur des Thermometers auf etwa 220–250° gestiegen ist. Alsdann leitet man Kohlensäure durch, um die letzten Reste der Salzsäure zu vertreiben. Zur Entfernung von

<sup>1</sup> LOCKEMANN: Zeitschr. angew. Chem. 1922, 35, 357.

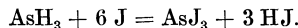
Spuren gebildeter Schwefliger Säure wird die Schwefelsäure nach Zusatz einiger Permanganatkrystalle aus einer Glasretorte (Jenaer Glas) destilliert. Zur Herstellung der Chlorwasserstoffsäure bringt man in einen Kolben ein Gemisch aus 3 g Jodkalium, in 10 g Wasser gelöst, und 50 g chemisch reinem Natriumchlorid. Auf dieses feuchte Salzgemisch läßt man aus einem Tropftrichter 60 ccm konz. Schwefelsäure tropfen. Das entweichende Gas wird durch konz. Salzsäure geleitet, die sich in einer Waschflasche befindet. Die Schwefelsäure kann nach LOCKEMANN, MARSH oder BECK und MERRES auf Arsen geprüft werden.

Die mit Ammoniak abgestumpfte Säure darf durch Schwefelwasserstoff nicht verändert werden. Eine Trübung oder Färbung würde Schwermetalle anzeigen. Mit BETTENDORFF'schem Reagens gemischt, darf die Schwefelsäure in einer Verdünnung mit 2 Tln. Wasser und dem doppelten Volum Zinnchlorürlösung keine rote Abscheidung geben.

Schwefelwasserstoff. Die bequemste Darstellung arsenfreien Schwefelwasserstoffs ist die, gewöhnlichen Schwefelwasserstoff aus Schwefeleisen und Salzsäure herzustellen und diesen in Natronlauge zu leiten. Es entsteht eine wäßrige Lösung von Natriumsulfid bzw. Natriumsulfhydrat. Diese Lösung läßt man langsam aus einem Scheidetrichter in eine Entwicklungsflasche tropfen, in der sich verd. Schwefelsäure befindet. Der sich entwickelnde Schwefelwasserstoff wird vor dem Einleiten in die Flüssigkeit noch durch Wasser gewaschen.

Auch aus Bariumsulfid, das in Würfeln gepreßt ist und sich in einem KIPPSchen Apparat befindet, kann durch Zersetzung mit verd. Salzsäure reiner, arsenfreier Schwefelwasserstoff hergestellt werden.

Ferner kann man aus arsenhaltigem Schwefelwasserstoff durch Überleiten über Jod arsenfreien Schwefelwasserstoff herstellen. Die Reaktion ist folgende:



Man leitet den aus Schwefeleisen und Salzsäure entwickelten Schwefelwasserstoff durch eine Glasröhre von etwa 40 cm Länge und 0,7—1 cm lichter Weite, in der sich auf Glaswolle fein verteiltes Jod befindet. Der Schwefelwasserstoff muß vorher durch Chlorcalcium getrocknet werden. Bevor er in die zu untersuchende Flüssigkeit eingeleitet wird, muß er noch zur Entfernung von Jod durch Jodkaliumlösung, das sich in einer Waschflasche befindet, gewaschen werden. Wichtig für eine völlige Arsenabsorption ist, daß nur Blase für Blase des Schwefelwasserstoffgases die Jodröhre passieren darf. Um zu prüfen, daß kein Arsen mehr mit übergeht, kann man am Ende des Rohres, also bevor das Gas in die Waschflasche mit Jodkaliumlösung gelangt, ein etwa 10 cm langes Rohr, das ebenfalls mit Jod und Glaswolle gefüllt ist, einschalten. In diesem Rohr darf nach beendetem Einleiten Arsen nicht nachweisbar sein.

Um allgemein Schwefelwasserstoff auf Arsengehalt zu prüfen, verfährt man in der Weise, daß man das entwickelte Schwefelwasserstoffgas durch mehrere Waschflaschen, die 10%ige Natronlauge enthalten, leitet und das vom Schwefelwasserstoff befreite Gas in etwa 25%iger arsenfreier Salpetersäure auffängt. Nach einigen Stunden wird die Salpetersäure mit etwa 10 ccm arsenfreier, konz. Schwefelsäure versetzt, die Lösung eingedampft und solange in einer Porzellanschale auf einem Sandbade erhitzt, bis weiße Nebel sich bilden. Der Rückstand wird mit Wasser verdünnt und wie bei Ammoniak auf Arsen geprüft.

Wasser. Auch das destillierte Wasser kann Spuren Arsen enthalten. Um es zu reinigen, wird es der Destillation über Natriumbicarbonat unterworfen. Zur Prüfung auf Arsen werden einige Liter mit etwas Salpetersäure angesäuert und nach dem Eindampfen und Abrauchen der Salpetersäure unter Zusatz von Schwefelsäure wie bei Ammoniak auf Arsen geprüft. Die Anwesenheit von Schwermetallen wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff festgestellt. Eine bräunliche Färbung würde solche anzeigen.

Wasserstoff. Um den aus Zink und Säure entwickelten Wasserstoff von Arsenwasserstoff zu befreien, leitet man ihn durch Waschflaschen, die eine Kaliumpermanganatlösung enthalten.

Weinsäure. Sie darf keine Schwermetalle enthalten; eine wäßrige Lösung darf durch Schwefelwasserstoff nicht gefärbt werden.

Zink. Das Zink darf weder Phosphor noch Arsen enthalten. Auch muß es frei von Eisen sein. Die Prüfung auf Phosphor s. S. 1284. Auf Arsen kann man das Zink nach LOCKEMANN oder BECK u. MERRES prüfen (S. 1399). Im Handel ist jetzt arsenfreies Zink leicht erhältlich.

## 5. Lösungsmittel für organische Stoffe.

Äther. Zur Reinigung wird der Äther zuerst mit schwefelsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser in einem Scheidetrichter mehrmals ausgeschüttelt und über gekörntem Chlorcalcium getrocknet. Der Äther wird der fraktionierten Destillation unterworfen und die mittlere Fraktion für Untersuchungszwecke aufgehoben, die zur völligen Reinigung über metallischem Natrium nochmals rektifiziert wird.

Alkohol. 96%iger absoluter Alkohol wird unter Zusatz von etwas Weinsäure destilliert.

Aceton wird durch fraktionierte Destillation unter Zusatz von Weinsäure gereinigt. Amylalkohol wird wie Aceton behandelt.

Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff werden wie Äther gereinigt.

Glycerin enthält wohl stets Arsen und darf bei Nachweis von Arsen nicht mit den fraglichen Objekten in Berührung gekommen sein.

Petroläther wird wie Äther gereinigt.

### Buch-Literatur.

W. AUTENRIETH: Die Auffindung der Gifte und stark wirkenden Arzneistoffe. — Nachweis und Bestimmung der Gifte auf chemischem Wege (Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Lief. 32). — G. BAUMERT: Lehrbuch der gerichtlichen Chemie, Bd. 1 u. 2. — H. DRAGENDORFF: Die gerichtlich-chemische Ermittlung von Giftstoffen. — L. EKKERT: Erkennung organischer Verbindungen im besonderen von Arzneimitteln. Stuttgart: Ferdinand Enke. — F. FEIGL: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. Leipzig: Akad. Verlagsgesellschaft. — H. FREUND: Leitfaden der colorimetrischen Methoden. — H. FÜHNER: Nachweis und Bestimmung von Giften auf pharmakologischem Wege. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Lief. 67. — J. GADAMER: Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte. — GERLACH u. SCHWEIZER: Die chemische Emissions-Spektralanalyse. — C. KIPPENBERGER: Grundlagen für den Nachweis von Giftstoffen. — A. J. KUNKEL: Handbuch der Toxikologie. — PRANDTL, GEBELE u. FESSLER: Gaskampfstoffe und Gasvergiftungen. München: Verlag der Ärztlichen Rundschau. — TH. SABALITSCHKA: Nachweis und Bestimmung von Giften auf physikalischem Wege. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 7, Heft 3. — E. SCHMIDT: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. — P. SCHMIDT u. F. WEYRAUCH: Über die Diagnostik der Bleivergiftung im Lichte moderner Forschung. Jena: Gustav Fischer. — G. SCHUMM: Die spektrochemische Analyse natürlicher organischer Farbstoffe. — H. STOLTZENBERG: Darstellungsvorschriften für Ultragifte, Hamburg. — F. P. TREADWELL: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, Bd. 1 u. 2. — UTERMARK: Chemische Kampfstoffe und Industriegifte. Hamburg: Otto Meissner. — ARNOLD VATTER: Giftgase und Gasschutz. Stuttgart: Dieck-Verlag.

# Mathematische Auswertung von Untersuchungsergebnissen.

Von

Professor **DR. A. TIMPE** und Professor **DR. J. GROSSFELD**-Berlin.

Mit 6 Abbildungen.

Da unsere Lebensmittel in der Regel aus einer größeren Anzahl chemischer Verbindungen bestehen, andererseits aber auch die Stoffe, mit denen Lebensmittel verfälscht zu werden pflegen, die Stoffe, in die sie bei Verbesserungen oder Verschlechterungen durch natürliche oder vom Hersteller gewollte Vorgänge ungewandelt werden können, Gemische oder Verbindungen chemischer Stoffe, nicht selten qualitativ gleicher oder ähnlicher Art wie beim normalen Lebensmittel aber in anderen Mischungsverhältnissen sind, kann die Entscheidung der Frage, ob das untersuchte Lebensmittel abweicht, und in welchem Grade es abweicht, gewöhnlich nur aus quantitativen Feststellungen abgeleitet werden. Die Fixierung nach Bewertung dieser quantitativen Feststellungen oder Meßergebnisse vollzieht sich nach mathematischen Methoden, insbesondere nach den Regeln der mathematischen Statistik und Fehlerlehre. Ihre Nichtbeachtung besonders bei der Auswertung der gefundenen Zahlenwerte, also weiterhin bei der Beurteilung der Lebensmittel kann leicht zu erheblichen Irrtümern Veranlassung geben. Nach der anderen Seite hin kann die mathematische Verarbeitung einer Reihe von Messungen außerordentlich zur Erhöhung der Klarheit und Schärfe bei der Beurteilung beitragen, gesetzmäßige Zusammenhänge herausstellen und unter Umständen selbst neue Wege und Mittel für das Erkennen und Forschen auf dem Gebiete der Lebensmittelchemie aufzeigen.

Im folgenden sollen kurz die wichtigsten Hilfsmittel, die zur mathematischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse in Frage kommen, behandelt werden.

## A. Zuverlässigkeit von Untersuchungsergebnissen und ihre Prüfung.

### 1. Genauigkeit der Messungen. Streuung der Beobachtungsfehler.

Wie bei allen zahlenmäßigen Feststellungen auf dem Gebiete der Naturwissenschaften sind auch die bei der Untersuchung der Lebensmittel erhaltenen Zahlenwerte von begrenzter Genauigkeit. Für die Ableitung von Schlüssen aus den Ergebnissen ist es zunächst notwendig, die Genauigkeit derselben richtig zu beurteilen.

Zur Überschätzung der Genauigkeit verleitet oft ein hoher, aber der Natur der Sache nicht entsprechender Rechenaufwand: Mitschleppen von zahlreichen Dezimalstellen usw. Wenn die Beobachtungsunterlagen unsicher sind, z. B. gewisse Nebenumstände wie Temperatur, Lösungsgeschwindigkeit,

nicht genügend beachtet werden, so kann ein solcher Mangel keineswegs wettgemacht werden durch minutiöse Genauigkeit bei der rechnerischen Auswertung. Die Angabe vieler Dezimalstellen im endgültigen Zahlenausdruck, in dem nur wenige zuverlässig gesichert sind, würde zu unzulässigen Schlußfolgerungen führen.

Die Genauigkeit der rechnerischen Auswertung soll also zur Genauigkeit der Unterlagen im richtigen Verhältnis stehen. Den Ausgangspunkt für die Beurteilung der Genauigkeit bei Messungen bildet der Beobachtungsfehler. Eine Steigerung der Genauigkeit setzt Erkennung der Umstände, die den oder die Beobachtungsfehler verursachen, voraus. Sind mehrere solche Umstände vorhanden, so gibt stets der Umstand den Ausschlag, der den größten Fehler bedingt. Man wird zunächst dessen Beseitigung erstreben.

Wir nennen Fehler, bei denen eine einheitliche Tendenz nicht feststellbar ist, zufällige Fehler, im Unterschied von den erkennbar durch die Methode bedingten systematischen Fehlern, die nach einer Richtung liegen; letztere lassen sich durch Abänderung der Methode beseitigen oder, nachdem ihr Durchschnittswert gesondert ermittelt ist, durch Rechnung ausschalten.

Das Folgende bezieht sich im allgemeinen nur auf zufällige Fehler.

#### a) Begriff des mittleren und des wahrscheinlichen Fehlers<sup>1</sup>.

Die Größe eines Fehlers erkennt man, indem man dieselbe Messung wiederholt ausführt und dann die Abweichungen miteinander vergleicht. Man berechnet zunächst von sämtlichen Beobachtungen den arithmetischen Mittelwert und stellt dann fest, um wieviel die Einzelmessungen von diesem Mittelwert abweichen. Der Mittelwert stellt den wahrscheinlichsten Wert der gesuchten Größe dar und wird als Ergebnis des ganzen Verfahrens genommen. Die Abweichungen  $\xi_i$  vom Mittelwert bilden die Grundlage für die Beurteilung der Verteilung der wahren Fehler  $x_i$ .

Man kann nun wieder das arithmetische Mittel dieser Abweichungen ohne Beachtung des Vorzeichens berechnen und hat in dieser Zahl ein Maß für die Genauigkeit des Ergebnisses.

Vom Standpunkt einer einheitlichen Fehlertheorie aus erweist es sich als zweckmäßiger, mit der quadratischen Streuung oder dem sog. mittleren Fehler  $\varepsilon$  zu arbeiten. Sein Quadrat ist definiert als der Mittelwert der Quadrate der wahren Fehler  $x_i$  bei einer hinreichend großen Zahl  $n$  der Messungen:

$$\varepsilon^2 = \frac{\sum x_i^2}{n}.$$

Bei einer begrenzten Zahl  $n$  von Messungen erhalten wir, wie die Fehlertheorie zeigt, seinen wahrscheinlichsten Wert, wenn wir die Summe  $S$  der Quadrate der Abweichungen  $\xi_i$  durch  $n - 1$  dividieren und die Quadratwurzel aus dem Quotienten bilden:

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{S}{n-1}}.$$

Es zeigt sich, daß die aus verschiedenen Versuchsreihen abgeleiteten Mittelwerte ihrerseits eine quadratische Streuung  $E$  aufweisen, und zwar ist

$$E = \frac{\varepsilon}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{S}{n(n-1)}}.$$

<sup>1</sup> E. CZUBER: Theorie der Beobachtungsfehler. Leipzig 1891. — E. CZUBER: Wahrscheinlichkeitsrechnung. Leipzig 1924. — F. HACK: Wahrscheinlichkeitsrechnung. Leipzig: S. Götschen 1911.



Genügt die Fehlerverteilung dem von GAUSS aufgestellten normalen Häufigkeitsgesetz (vgl. Abb. 1)

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\varepsilon} e^{-\frac{x^2}{2\varepsilon^2}},$$

so errechnet sich der „wahrscheinliche Fehler“ aus dem mittleren Fehler durch Multiplikation mit 0,674.

Bezeichnen wir den wahrscheinlichen Fehler einer einzelnen Messung mit  $f$ , den des Mittelwertes mit  $F$ , so ist also

$$f = \pm 0,674 \sqrt{\frac{S}{n-1}}; \quad F = \pm 0,674 \sqrt{\frac{S}{n(n-1)}}.$$

Diese Ausdrücke besagen, daß die der Einzelmessung bzw. dem Mittelwert anhaftenden Fehler mit gleicher Wahrscheinlichkeit — d. h. mit gleicher relativer Häufigkeit — kleiner und größer als  $f$  und  $F$  ausfallen.

Diese Formeln können uns auch ein Maß in die Hand geben, wie oft es sich empfiehlt, eine Feststellung durch weitere Einzelversuche zu wiederholen, um Sicherheit des Ergebnisses und Aufwand an Versuchsarbeit gegeneinander abzustimmen. Nach der obigen Gleichung

$$E = \frac{\varepsilon}{\sqrt{n}}$$

ist der mittlere Fehler des Versuchsergebnisses umgekehrt proportional nicht mit der Anzahl der Beobachtungen  $n$ , sondern mit der Quadratwurzel aus  $n$ . Durch 4malige Beobachtung erreicht man also nicht eine 4fache, sondern nur eine doppelte Genauigkeit, durch 100malige Beobachtung erst eine 10malige Genauigkeit usw.

#### b) Einfluß der Beobachtungsfehler auf das Endergebnis. Aus verschiedenen Komponenten resultierender Fehler.

Für die Ausschaltung von systematischen, z. B. einem Meßinstrument anhaftenden Fehlern, und für die praktisch außerordentlich wichtige Feststellung, welcher einzelne Fehler das Endresultat mehr als ein anderer beeinflusst, ist es von großer Bedeutung, den Einfluß einer einzelnen Abweichung zu erkennen. Das einfachste Mittel hierzu gibt uns die Differentialrechnung. Ein Beispiel möge dies erläutern. Bei Fetten berechnen wir gewöhnlich die Verseifungszahl  $V$  aus dem Titrationswert mit halbnormaler Salzsäure  $a$  und der Vorlage  $v$ , dem halben Molekulargewicht von  $KOH$  sowie der Einwaage  $A$  nach der Gleichung:

$$V = \frac{56,11}{2} \cdot \frac{v-a}{A}.$$

Wenn wir nun feststellen wollen, welchen Einfluß ein Titrationsfehler bei  $v$  oder  $a$ , bzw.  $(v-a)$  auf  $V$  hat, setzen wir, wie es in der Differentialrechnung üblich ist:

$$V = Y \quad v-a = X$$

und erhalten

$$Y = \frac{56,11}{2} \cdot \frac{X}{A}.$$

Nun muß offenbar eine sehr kleine Änderung von  $X$  (der Versuchsfehler), die wir  $\Delta X$  nennen wollen, bei  $Y$  eine der letzten Gleichung entsprechende Änderung bewirken, die wir  $\Delta Y$  nennen wollen. Das Verhältnis beider zu einander stimmt mit dem Differentialquotienten  $\frac{dY}{dX}$  um so genauer überein, je kleiner  $\Delta X$  und

demgemäß auch  $\Delta Y$ . Nun ist  $\frac{\Delta Y}{\Delta X} \approx \frac{dY}{dX} = \frac{56,11}{2} \cdot \frac{1}{A}$ . Daher  $\Delta Y \approx \Delta X \cdot \frac{56,11}{2} \cdot \frac{1}{A}$ .  
Betrag die Einwaage  $A = 2$  g, so können wir leicht ausrechnen:

$$\Delta Y \approx 14,0 \Delta X.$$

Ein Titrationsfehler ( $\Delta X$ ) von z. B. 0,1 ccm bewirkt also einen 14,0fachen Verseifungszahlfehler, also von 1,4 Einheiten.

Diese Art der Berechnung — nach dem Begriff der Differentialrechnung um so genauer, je kleiner die Abweichungen sind, wie es gerade hier am wertvollsten ist — ist stets dann anwendbar, wenn das Endergebnis eine bestimmte, wenn auch verwickelte, Funktion der Beobachtungsgröße ist.

Bei zufälligen Fehlern drückt sich der mittlere Fehler  $\varepsilon_y$  des Ergebnisses  $Y$  ganz entsprechend durch den mittleren Fehler  $\varepsilon_x$  der Beobachtungsgröße  $X$  aus.

$$\varepsilon_y \approx \frac{dy}{dx} \cdot \varepsilon_x.$$

Ist das Endergebnis  $W$  eine Funktion  $W = \varphi(X, Y, Z, \dots)$  von mehreren Beobachtungsgrößen  $X, Y, Z, \dots$ , so ist der Zusammenhang zwischen den Einzelfehlern  $\Delta X, \Delta Y, \Delta Z, \dots$  und  $\Delta W$  gegeben durch

$$\Delta W = \frac{\partial W}{\partial X} \cdot \Delta X + \frac{\partial W}{\partial Y} \cdot \Delta Y + \frac{\partial W}{\partial Z} \cdot \Delta Z.$$

Für die mittleren Fehler  $\varepsilon_x, \varepsilon_y, \varepsilon_z, \dots$  und  $\varepsilon_n$  gilt der verallgemeinerte pythagoräische Lehrsatz

$$\varepsilon_w \approx \sqrt{\left(\frac{\partial W}{\partial X} \varepsilon_x\right)^2 + \left(\frac{\partial W}{\partial Y} \varepsilon_y\right)^2 + \left(\frac{\partial W}{\partial Z} \varepsilon_z\right)^2 + \dots}$$

## 2. Biologische Streuung und deren mathematische Festlegung.

Unsere Lebensmittel sind zum großen Teil Produkte von biologischen, oft außerordentlich verwickelt verlaufenden Vorgängen, deren restlose Erkenntnis von uns bei weitem noch nicht erreicht ist, von denen wir aber wissen, daß diese Produkte in ihrer Zusammensetzung außerordentlich verschieden ausfallen können. Wir sprechen von „Schwankungen“ an bestimmten Bestandteilen und zahlenmäßig feststellbaren Eigenschaften, den sog. „Kennzahlen“. Besser ist es, diese Erscheinung, wie es sonst in Naturwissenschaft und Technik üblich ist, als Streuung zu bezeichnen. Diese biologische Streuung<sup>1</sup> hat auf die Zuverlässigkeit der Ergebnisse den gleichen Einfluß wie die Versuchsfehler.

In vielen Fällen ist diese Streuung um ein Mehrfaches größer als die Höhe der Beobachtungsfehler. Dann ist die biologische Streuung ausschlaggebend für die Zuverlässigkeit des Endergebnisses.

Beispiel: Bei der Ermittlung des Wasserzusatzes von Fleischwaren nach FEDER bestimmen wir zunächst Wasser, Fett und Asche. Von diesen gilt die Fettbestimmung als am wenigsten genau. Sie ist es also zunächst, die für die Genauigkeit der folgenden Berechnung des organischen Nichtfettes den Ausschlag gibt. Das organische Nichtfett aber unterliegt bei Fleisch in seinem Mengenverhältnis zum Wassergehalt (FEDERsche Zahl) Schwankungen, die um ein Mehrfaches größer sind als die Unsicherheiten in der Fettbestimmung. Also wird die Genauigkeit der Ermittlung des Wasserzusatzes von der Größe dieser Streuung, nicht mehr von den Fehlern der Fettbestimmung wesentlich beeinflusst.

### a) Zuverlässigkeit sog. Grenzzahlen.

Man hat früher versucht, die beobachteten äußersten Grenzen für Gehalte von Lebensmitteln an bestimmten Stoffen, seien sie nun wertvoller oder in

<sup>1</sup> Neben dieser biologischen kennen wir auch eine sonstige — z. B. durch Bearbeitungsverfahren bedingte — Streuung, die der gleichen Gesetzmäßigkeit unterliegt, aber meist viel kleiner ist.

anderen Fällen wertloser bzw. schädlicher Art, als Grenzzahlen (Grenzwerte) festzulegen und dann angenommen, daß Überschreitungen dieser Grenzen nicht vorkommen. Dieses Verfahren mußte daran scheitern, daß die Zahl der Beobachtungen, aus denen die Grenzwerte gezogen waren, naturgemäß ebenfalls eine begrenzte war. So hat man nach A. BÖMER<sup>1</sup> bei Butterfett für die REICHERT-MEISLSche Zahl zunächst als untere Grenzzahl 26 angenommen, ging dann nach umfangreicheren Untersuchungen auf 24, 22, 20 herunter und stellte unter gewissen Umständen auch bei reinem Butterfett sogar Zahlen unter 20 fest. Ähnliche Erfahrungen machte man mit anderen Fettkennzahlen oder z. B. bei dem Aschengehalt von Himbeersäften.

BÖMER unterscheidet bei derartigen Grenzzahlen, die er als „physiologische“ Grenzzahlen bezeichnet, eine besondere Gruppe, die durch bestimmte, verhältnismäßig konstante physiologische Eigenschaften des tierischen oder pflanzlichen Organismus bedingt sind, und rechnet hierzu z. B. die Grenzzahlen für die Gefrierpunktserniedrigung der Milch, die FEDERSche Zahl bei Fleisch u. a. Immerhin zeigen aber auch diese Zahlenwerte gewisse Streuungen, die im Einzelfalle Berücksichtigung verdienen und deren Kenntnis die Zuverlässigkeit des Ergebnisses richtiger beurteilen läßt.

Unbedingt berechtigt sind physikalische und chemische Grenzzahlen als Kennzeichen bestimmter chemischer Verbindungen oder bestimmter Gemische von solchen sowie Grenzzahlen bei gewissen künstlichen Produkten (Wassergehalt der Margarine, Alkoholgehalt von Branntwein), wie sie gesetzlich vorgeschrieben sind, und zwar deshalb, weil hierbei natürliche, ungewollte Streuungen nicht mehr in Frage kommen.

#### b) Größe der biologischen Streuung und ihre mathematische Festlegung.

Für wissenschaftliche Überlegungen sind also Grenzzahlen meist wenig brauchbar. Zuverlässiger ist es, auch hier wie bei der Fehlerberechnung vom Mittelwert auszugehen. Dieser Mittelwert wird durch einzelne Ausnahmen nicht wesentlich beeinflusst und durch Erhöhung der Zahl der Untersuchungen immer weiter gesichert. Dafür entsteht dann aber für den Beurteiler im Einzelfalle die Aufgabe, die Größe der biologischen Streuung zu ermitteln und zu berücksichtigen.

Die Streuungen bei biologischen Vorgängen und Produkten unterliegen, soweit die bisherigen Erfahrungen reichen, dem normalen Häufigkeitsgesetz und den darauf ruhenden Regeln der Wahrscheinlichkeitsrechnung bzw. mathematischen Statistik (neuerdings von K. DAEVES<sup>2</sup> Großzahlforschung genannt).

Die Berechnung der auf den Mittelwert bezogenen mittleren (quadratischen) Streuung  $\sigma$  und der „wahrscheinlichen“ Streuung vollzieht sich demgemäß genau so wie die Berechnung des mittleren und des wahrscheinlichen Beobachtungsfehlers. Hat man die mittlere Streuung  $\sigma$  der beobachteten Verteilung ermittelt, so kann man die relative Häufigkeit der Fälle, in denen eine gewisse Grenzzahl  $\pm b$  überschritten wird, mit Hilfe des GAUSSSchen Fehlerintegrals

$$\Phi(\beta) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\beta} e^{-x^2} dx$$

<sup>1</sup> A. BÖMER: Z. 1925, 30, 75—84.

<sup>2</sup> K. DAEVES: Praktische Großzahlforschung. Berlin 1933.

angeben. Eine genaue Tabelle der Funktion findet sich z. B. im Anhang von R. BECKER, H. PLAUT, J. RUNGE<sup>1</sup>.  $\Phi\left(\frac{b}{\sqrt{2}\sigma}\right)$  bedeutet den Bruchteil der Gesamtheit, der sich innerhalb eines zum Mittelwert  $M$  symmetrischen Wertebereichs von der Gesamtbreite  $2\frac{b}{\sigma}$  befindet. In dem neben-

| $\Phi\left(\frac{b}{\sqrt{2}\sigma}\right)$ | $\frac{b}{\sigma}$ | $(1 - \Phi) \cdot 100$<br>% |
|---|--------------------|-----------------------------|
| 0,1   | 0,126              |                             |
| 0,2   | 0,253              |                             |
| 0,3   | 0,383              |                             |
| 0,4   | 0,526              |                             |
| 0,5   | 0,675              | 50                          |
| 0,6   | 0,841              | 40                          |
| 0,683                                       | 1,00               | 31,8                        |
| 0,7   | 1,04               | 30                          |
| 0,8   | 1,28               | 20                          |
| 0,9   | 1,65               | 10                          |
| 0,93  | 1,82               | 7                           |
| 0,95  | 1,96               | 5                           |
| 0,96  | 2,06               | 4                           |
| 0,97  | 2,17               | 3                           |
| 0,98  | 2,33               | 2                           |
| 0,99  | 2,56               | 1                           |
| 0,995                                       | 2,82               | 0,50                        |
| 0,998                                       | 3,09               | 0,20                        |
| 0,9990                                      | 3,39               | 0,10                        |
| 0,9995                                      | 3,48               | 0,05                        |
| 0,9998                                      | 3,68               | 0,02                        |
| 0,9999                                      | 3,82               | 0,01                        |
| 0,99994                                     | 4,00               | 0,006                       |

stehenden Tabellenauszug gibt die dritte Spalte an, wieviel Prozent der Gesamtheit außerhalb dieses Bereichs (unterhalb  $M - b$  und oberhalb  $M + b$ ) liegen.

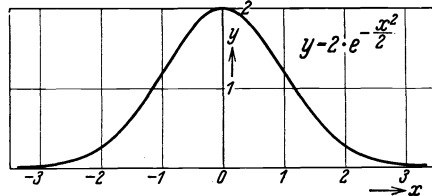


Abb. 1. Normale Häufigkeitskurve nach GAUSS.

Faßt man beispielsweise eine Grenzzahl  $b$  ins Auge, die das Doppelte der mittleren Streuung  $\sigma$  beträgt, so wird man nur noch in etwa 4—5% der Beobachtungsfälle „Ausreißer“ vor sich haben (solche, die unterhalb  $M - 2\sigma$  und oberhalb  $M + 2\sigma$  liegen).

Je mehr Einzelversuche man anstellt, um so größere Abweichungen vom Mittelwert wird man in einzelnen Fällen antreffen.

Über den Normalbegriff, weitere Grundlagen (Begriffsbestimmungen, Normalverteilung, Wahrscheinlichkeitsnetz) und Anwendung der Großzahlforschung in der Lebensmittelchemie (Urverteilung, numerische und logarithmische Teilungsklassenhäufigkeit, Häufigkeitsreihen mit verschiedener Streuungsbreite, Gemenge von Einzelkollektiven, Einfluß zeitlicher Veränderungen auf Häufigkeitsverteilungen, analytische Zerlegung einer Häufigkeitskurve) vgl. A. BECKEL<sup>2</sup>.

Als Hauptgrenzwert für Normalfestsetzungen in der Lebensmittelchemie schlägt BECKEL denjenigen Merkmalswert vor, unter- bzw. oberhalb dessen 5% der Proben fallen. In dem Normalbereich sind demnach 90% aller Befunde enthalten.

BECKEL hat ferner ein Wahrscheinlichkeitspapier zur klaren Darstellung von Häufigkeitskurven angegeben<sup>3</sup>.

## B. Ableitung von Gesetzmäßigkeiten aus Untersuchungsergebnissen.

Wenn durch eine ausreichende Reihe von Untersuchungen dargetan ist, daß zwischen verschiedenen für die Lebensmitteluntersuchung wesentlichen Beobachtungsgrößen ein gesetzmäßiger Zusammenhang besteht, so entsteht die Aufgabe, diesen Zusammenhang in mathematischer Form darzustellen, um in einem vorgelegten Einzelfall von dem Wert einer oder einiger dieser Größen

<sup>1</sup> R. BECKER, H. PLAUT u. J. RUNGE: Anwendungen der mathematischen Statistik auf Probleme der Massenfabrikation. Berlin: Julius Springer 1927.

<sup>2</sup> A. BECKEL: Z. 1933, 66, 158.

<sup>3</sup> Hersteller: Carl Schleicher & Schüll in Düren (Rhld.).

auf den einer anderen schließen zu können. Der Anblick der tabellarisch geordneten Statistik der Untersuchungsergebnisse selbst bietet hierfür nur ein unvollkommenes Hilfsmittel, weil er der gefühlsmäßigen Einstellung zu dem gesamten Zahlenmaterial, dem man gerecht werden soll, zu viel Spielraum läßt. Handelt es sich um zwei zu einander in Beziehung stehende, verschiedener Werte fähige Beobachtungsgrößen  $x, y$ , so verschafft oft schon die graphische Darstellung zusammengehöriger Werte in einem rechtwinkligen ebenen Koordinatensystem eine gute Einsicht in das zugrunde liegende Verknüpfungsgesetz.

Zeigt sich als Repräsentant desselben eine eindeutig erkennbare Kurve, so kann man mit ihrer Hilfe an einem beliebigen  $x$ -Wert den zugehörigen  $y$ -Wert interpolieren.

Die Extrapolation, bei der es sich um einen aus dem alten Beobachtungsbereich herausfallenden  $x$ -Wert handelt, bereitet schon Schwierigkeiten. Es entsteht also in vielen Fällen der Wunsch, den Zusammenhang der Beobachtungsgrößen durch einen analytischen Ausdruck darzustellen. Das gilt insbesondere dann, wenn der Zusammenhang, vielleicht wegen gewisser neben den Beobachtungsfehlern vorhandener biologischer Schwankungen, keinen eindeutig festen Charakter hat, sondern, wie man sagt, stochastischer Natur ist, d. h. ein im großen und ganzen zutreffendes, aber Abweichungen zulassendes Durchschnittsgesetz widerspiegelt. Je nach der Sachlage ergeben sich damit verschiedene Aufgaben der mathematisch-analytischen Erfassung der Gesetzmäßigkeit.

## 1. Erfassung fehler- und streuungsfreier Untersuchungsergebnisse durch Interpolationsformeln.

Darstellungen auf logarithmischem Papier.

Kennt man eine Reihe von als fehler- und streuungsfrei anzunehmenden zusammengehörigen Werten  $x_1, y_1; x_2, y_2; \dots x_n, y_n$  zweier Beobachtungsgrößen  $x, y$ , so wird man dem Ergebnismaterial gerecht durch den Ansatz  $y = y_1 + c_1(x - x_1) + c_2(x - x_1)(x - x_2) + \dots + c_{n-1}(x - x_1)(x - x_2) \dots (x - x_{n-1})$ .

Dieser Ansatz liefert in der Tat  $y = y_1$  für  $x = x_1$ , und die Konstanten  $c_1, c_2, \dots c_n$ , muß man nun der Reihe nach so bestimmen, daß auch zu  $x = x_2, \dots x = x_n$  die richtigen Werte  $y_2, \dots y_n$  herauskommen. Z. B. liefert die Bedingung, daß  $y = y_2$  für  $x = x_2$  herauskommen muß, die Formel:

$$y_2 = y_1 + c_1(x_2 - x_1); \text{ also } c_1 = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}.$$

Die Bedingung, daß  $y = y_3$  für  $x = x_3$  herauskommen muß, ergibt sodann  $c_2$ , und so fort. Auf diese Weise erhält man für  $y$  einen einfachen mathematischen Ausdruck, mit dem man zu jedem im alten Beobachtungsbereich oder außerhalb desselben liegenden  $x$ -Wert den zugehörigen  $y$ -Wert errechnen kann.

Beispiel: Das Volumen von 1 kg Wasser beträgt

|     |              |          |          |          |
|-----|--------------|----------|----------|----------|
| für | $x = 30^0$   | $40^0$   | $60^0$   | $70^0$   |
|     | $y = 1,0043$ | $1,0078$ | $1,0171$ | $1,0227$ |

Wie groß ist das Volumen für  $x = 50^0$ ?

Ansatz:  $y = 1,0043 + c_1(x - 30) + c_2(x - 30)(x - 40) + c_3(x - 30)(x - 40)(x - 60)$ .

1. Bedingung:  $1,0078 = 1,0043 + c_1 \cdot 10$ ;  $c_1 = \frac{1,0078 - 1,0043}{10} = 0,00035$ .

2. Bedingung:  $1,0171 = 1,0043 + 0,00035 \cdot 30 + c_2 \cdot 30 \cdot 20$ ;  $c_2 = \frac{0,0023}{30 \cdot 20} = 0,0000038$ .

3. Bedingung:  $1,0227 = 1,0043 + 0,00035 \cdot 40 + 0,0000038 \cdot 40 \cdot 30 + c_3 \cdot 40 \cdot 30 \cdot 10$ ;  
 $c_3 = \frac{0,0004}{40 \cdot 30 \cdot 10} = -0,00000003$ .

Die Interpolationsformel lautet also

$$y = 1,0043 + 0,00035(x - 30) + 0,0000038(x - 30)(x - 40) - 0,00000003(x - 30)(x - 40)(x - 60).$$

Damit ergibt sich für  $x = 50^\circ$ :

$$y = 1,0043 + 0,00035 \cdot 20 + 0,0000038 \cdot 20 \cdot 10 + 0,00000003 \cdot 20 \cdot 10 \cdot 10 = 1,0121.$$

Die gewöhnliche „lineare“ Interpolation zwischen  $40^\circ$  und  $60^\circ$  hätte den Wert  $y = 1,0125$  geliefert. Da die vierte Dezimale bei den Beobachtungsergebnissen noch als gesichert angesehen werden kann, ist anzunehmen, daß die Anwendung der verbesserten Interpolationsformel der Sachlage mehr gerecht wird.

Sie besitzt den Vorteil, daß die Verwertung neuer Beobachtungsergebnisse durch Hinzunahme weiterer Glieder ohne weiteres möglich ist, wenn dies zur

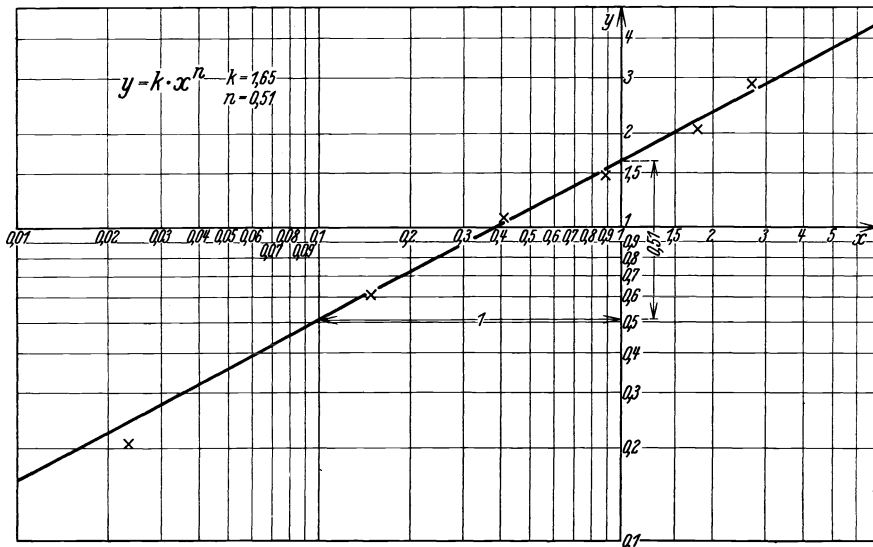


Abb. 2. Adsorptionsisotherme nach FREUNDLICH in doppelt logarithmischer Darstellung.

Erreichung größerer Genauigkeit geboten erscheint. Die schon bestimmten Koeffizienten  $c$  erleiden dadurch keine Änderung. Im vorliegenden Beispiel liefert das vierte Glied den Beitrag 0,00006.

Die Formel ist aufgebaut aus einem konstanten, einem linearen Glied und einfachen Potenzausdrücken  $a_2x^2$ ,  $a_3x^3$ ... , d. h. Gebilden, deren graphisches Bild die Mathematik als Parabeln 2., 3. und höheren Grades bezeichnet.

Besteht die Vermutung, daß der Zusammenhang zwischen  $x$  und  $y$  durch einen einzigen Ausdruck  $y = a_n x^n$  wiedergegeben wird, so daß es sich bei der graphischen Darstellung in den gewöhnlichen rechtwinkligen Koordinaten um eine Parabel  $n$ -Grades handeln würde, so empfiehlt sich zur einfachen Ermittlung der Konstanten  $a_n$  und  $n$  die Darstellung auf doppelt logarithmischem Papier<sup>1</sup>. Auf solchem besitzt sowohl die Abscissen- wie die Ordinatenachse die vom Rechenschieber her bekannte logarithmische Teilung: Abgetragen sind die Strecken  $\xi = \log x$ ,  $\eta = \log y$ , angeschrieben sind die Werte  $x$  bzw.  $y$ . Durch Logarithmieren geht nun der Ausdruck  $y = a_n x^n$  über in  $\log y = \log a_n + n \log x$  oder  $\eta = a_n + n\xi$ , wenn  $\log a_n = a_n$  gesetzt wird. Im  $(\xi, \eta)$ -System wird dies durch eine gerade Linie dargestellt, und zwar bedeutet  $n$  die Steigung,

<sup>1</sup> Zu beziehen durch Schleicher & Schüll-Düren.

d. h. den Tangens des mit der Abscissenachse gebildeten Winkels,  $a_n$  den Abschnitt auf der Ordinatenachse, dessen Endpunkt mit  $a_n$  beziffert ist, weil  $a_n = \log a_n$ . Also können  $n$  und  $a_n$  unmittelbar aus der graphischen Darstellung auf doppelt logarithmischem Papier entnommen werden, wenn die Gerade durch zwei Punkte  $(\xi_1, \eta_1)$  und  $(\xi_2, \eta_2)$  festgelegt ist, die zwei Paaren zusammengehöriger Beobachtungswerte  $x_1, y_1$  und  $x_2, y_2$  entsprechen. Die Steigung erhält man aus

$$n = \frac{\eta_2 - \eta_1}{\xi_2 - \xi_1} = \frac{\log y_2 - \log y_1}{\log x_2 - \log x_1}$$

graphisch oder rechnerisch. Dabei kann  $n$  auch eine gebrochene Zahl bedeuten.

Beispiel: Die FREUNDLICHsche Adsorptionsisotherme. Variiert man bei konstantem Volumen der Lösung und konstanter Temperatur die Menge  $m$  der absorbierenden Kohle und die des Adsorbendum, so steht nach eingetretenem Adsorptionsgleichgewicht die Konzentration  $x$  des noch in Lösung befindlichen Adsorbendum zur adsorbierten Menge  $y$  desselben in folgender Beziehung<sup>1</sup>:

$$y = \frac{\eta}{m} = k x^n,$$

worin  $m$  die Gewichtsmenge der Kohle bedeutet.  $k$  ist eine Konstante, die von der zufälligen Beschaffenheit der Kohle abhängt und als ein Maß für ihr Adsorptionsvermögen angesehen werden kann;  $n$  ist eine Konstante, die von der Art des Adsorbendum abhängt. Bei einer mit Aceton (100 ccm Lösungsquantum) durchgeführten Versuchsreihe wurden folgende Zahlen ermittelt:

|   |                |        |        |        |        |        |
|---|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Menge der Kohle in Gramm                          | $m = 0,8987$   | 1,0320 | 1,0688 | 1,0951 | 1,2425 | 1,2556 |
| Konzentration in Normalität                       | $x = 0,0234$   | 0,1465 | 0,4103 | 0,8862 | 1,776  | 2,690  |
| Adsorbierte Menge Aceton im ganzen . . . . .      | $\eta = 0,187$ | 0,638  | 1,154  | 1,64   | 2,58   | 3,62   |
| Adsorbierte Menge Aceton je Gramm Kohle . . . . . | $y = 0,208$    | 0,618  | 1,077  | 1,498  | 2,08   | 2,88   |

Stellen wir die den Werten  $x, y$  entsprechenden Punkte auf doppelt logarithmischem Papier fest (vgl. Abb. 2), so liegen sie mit ausreichender Annäherung auf einer Geraden:  $\log y = \log k + n \log x$ . Der Abschnitt auf der Ordinatenachse liefert uns  $k = 1,65$ . Die Steigung  $n$  der Geraden erhalten wir, wenn wir mit einem Millimetermaßstab den Ordinatenzuwachs ablesen, der zum Abscissenzuwachs 1 gehört. Letzterer findet sich z. B. zwischen der mit 0,1 und 1 bezifferten Punkten der  $x$ -Achse, da  $\log 0,1 = -1$ ;  $\log 1 = 0$ . Auf diese Weise ermitteln wir  $n = 0,51$ .

Bemerkung. Die Gerade, die der Theorie entsprechend bereits durch zwei Wertepaare bzw. Punkte festzulegen wäre, ist hier aus sämtlichen Wertepaaren durch graphischen Ausgleich gewonnen. Wegen der mathematischen Durchführung der Ausgleichung vgl. unter B. 2.

Bei chemischen Vorgängen spielt erfahrungsgemäß das Gesetz vom organischen Wachstum und das Abklingungsgesetz eine große Rolle. Der mathematische Ausdruck ist die allgemeine Exponentialfunktion  $y = y_0 10^{\mu x}$ ; die Konstante  $\mu$  ist im ersten Fall positiv, im zweiten Fall negativ; die Konstante  $y_0$  ist der Wert, den  $y$  für  $x = 0$  annimmt. In den Anwendungsbeispielen bedeutet  $x$  meist die Zeit. Besteht bei einer Versuchsreihe die Vermutung, daß der Zusammenhang zwischen den Beobachtungsgrößen  $x, y$  durch eine

<sup>1</sup> Vgl. L. MICHAELIS: Praktikum der physikalischen Chemie, 2. Aufl. S. 128, wo  $c$  statt  $x$  und  $x$  statt  $y$  gesetzt ist.

solche allgemeine Exponentialfunktion ausgedrückt werden kann, so empfiehlt sich zur einfachen Ermittlung der Konstanten  $y_0$  und  $\mu$  die Darstellung auf einfach logarithmischem Papier. Auf solchem besitzt die Abscissenachse die reguläre Teilung. Dagegen besitzt die Ordinatenachse logarithmische Teilung: abgetragen sind die Strecken  $\eta = \log y$ , angeschrieben sind die Werte  $y$ . Durch Logarithmieren geht nun der Ausdruck  $y = y_0 \cdot 10^{\mu x}$  über in  $\log y = \log y_0 + \mu x$ , oder  $\eta = \eta_0 + \mu x$ , wenn  $\log y_0 = \eta_0$  gesetzt wird. Im  $(x, \eta)$ -System wird dies durch eine gerade Linie dargestellt; und zwar bedeutet  $\mu$  die Steigung, die beim organischen Wachstum positiv, beim Abklingungsgesetz negativ ist;  $\eta_0$  bedeutet den Abschnitt auf der Ordinatenachse, dessen Endpunkt mit  $y_0$  beziffert ist, da  $\eta_0 = \log y_0$ . Also können  $y_0$  und  $\mu$  unmittelbar aus der Darstellung auf einfach logarithmischem Papier abgelesen werden, wenn

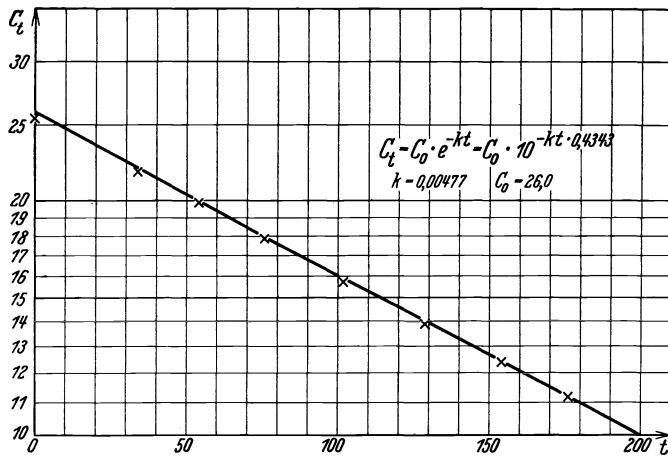


Abb. 3. Saccharoseinversion in einfach logarithmischer Darstellung.

die Gerade durch zwei Punkte festgelegt ist, die zwei Paaren zusammengehöriger Werte  $x_1, y_1$  und  $x_2, y_2$  entsprechen.

Beispiel<sup>1</sup>. Inversionsgeschwindigkeit eines Geisenheimer Weines (1902er) bei ungefähr 76°. Durch Zusatz eines genau bestimmten Quantums Saccharose zu fermentfreiem Wein wird ein Inversionsvorgang eingeleitet, der nach dem Gesetz

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} = C_0 \cdot 10^{-kt \cdot 0,4343}$$

erfolgt, worin  $C_0$  die Konzentration der Saccharose in der Lösung zur Zeit  $t = 0$ ,  $C_t$  diejenige nach  $t$  Minuten,  $e$  die Basis des natürlichen Logarithmensystems,  $k$  die den Säuregrad des Weines bestimmende Inversionskonstante sind. Beobachtet wurde für

| $t =$  | 0    | 34      | 54      | 76      | 102     | 129     | 154     | 176     |
|--|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| $C_t =$                                      | 25,5 | 21,8    | 19,8    | 17,9    | 15,7    | 13,8    | 12,4    | 11,2    |
| $k = \frac{\log C_0 - \log C_t}{0,4343 t} =$ |      | 0,00461 | 0,00468 | 0,00465 | 0,00475 | 0,00476 | 0,00468 | 0,00468 |
| $k$ reduziert auf 76,0°                      |      | 0,00468 | 0,00476 | 0,00472 | 0,00484 | 0,00483 | 0,00475 | 0,00475 |

Wir haben  $\log C_t = \log C_0 - kt \cdot \log e = \log C_0 - 0,4343 k \cdot t$  oder  $\eta = \eta_0 - 0,4343 k \cdot t$ . Bei der Darstellung auf einfach logarithmischem Papier (Abb. 3)

<sup>1</sup> Vgl. R. HAMMERSCHMIDT: Z. Ver.Rübenzuckerind. 1890, 40, 465—479 und TH. PAUL: Z. 1914, 28, 559.



müssen die zu  $t$ ,  $\log C_t$  gehörenden Punkte, wenn einheitlich auf  $76,0^0$  reduziert wird, auf einer Geraden liegen. Ihr Abschnitt auf der Ordinatenachse ist durch  $\eta_0 = \log C_0$  (reduziert = 26,0) festgelegt. Für die Festlegung ihres Gefälles  $-\mu = 0,4343 k = \frac{\log C_0 - \log C_t}{t}$  würde an sich ein weiterer Punkt, d. h. ein weiteres Wertepaar  $t$ ,  $C_t$  genügen, und damit wäre  $k$  bestimmt. Berechnet man die  $k$ -Werte, die den verschiedenen aus dem Beobachtungsmaterial sich ergebenden Punkten entsprechen (Zeile 3 der Tabelle) und reduziert sie auf  $76,0^0$  (Zeile 4), so ergibt sich als Mittelwert  $k = 0,00477$ . (Dabei ist der zu  $t = 34$  gehörende Punkt als unsicher außer acht gelassen.) Ihm entspricht die in der Abb. 3 eingetragene Gerade.

Auch biologische Abklingvorgänge wie die Abhängigkeit der Abtötung von Tuberkelbacillen in Milch von Pasteurisierungstemperatur und -zeit lassen sich ebenso wie die Zeit-Temperatur-Maxima, auf die Milch ohne Schädigung der Aufrahmung die erhitzt werden kann, nach A. C. DAHLBERG<sup>1</sup> auf einfachlogarithmischem Papier als gerade Linien darstellen.

## 2. Glätten der die Beobachtungsergebnisse darstellenden Kurve.

### Ausgleichungspolynome<sup>2</sup>.

Hat man eine Reihe zusammengehöriger Werte von zwei zueinander in Beziehung stehenden Größen  $x$ ,  $y$  durch Punkte in einem ebenen Koordinatensystem dargestellt, so zeigt eine Kurve, die man genau durch diese sämtlichen Punkte hindurchlegt, in der Regel einen wenig glatten Verlauf. Man wird dies oft den unvermeidbaren Beobachtungsfehlern, die den einzelnen Werten anhaften, und in vielleicht noch größerem Maße der biologischen oder natürlichen Streuung zuschreiben und versuchen, eine glatte Kurve zu ziehen, durch die diese Einflüsse bestmöglich ausgeglichen werden, so nämlich, daß sich die ursprünglich erhaltenen Punkte einigermaßen gleichmäßig auf beide Seiten der Ausgleichungskurve verteilen. Nach einem in der Meteorologie üblichen Verfahren wird dies in dem Falle, in dem die  $x$ -Werte äquidistant sind, d. h. um gleiche Dekremente wachsen, mit einiger Annäherung dadurch erreicht, daß man an der Stelle  $x_i$  den Mittelwert des zugehörigen Ordinatenwerts  $y_i$  und der beiden Nachbarordinatenwerte  $y_{i-1}$  und  $y_{i+1}$  aufträgt, also die Strecke  $\frac{y_{i-1} + y_i + y_{i+1}}{3}$ . Besser wird die Annäherung in demselben Falle nach einem von RUNGE mit der Methode der kleinsten Quadrate begründeten Verfahren, das den zu  $x_i$  gehörigen Ordinatenwert  $y_i$  und die vier Nachbarwerte  $y_{i-2}$ ,  $y_{i-1}$ ,  $y_{i+1}$ ,  $y_{i+2}$  berücksichtigt. Aufgetragen wird an der Stelle  $x_i$  der Ordinatenwert

$$\eta_i = y_i - \frac{3}{35}(y_{i-2} - 4y_{i-1} + 6y_i - 4y_{i+1} + y_{i+2}).$$

Die Klammerwerte erhält man am einfachsten als die sog. vierten Differenzen

|           |           |                 |                 |                 |                 |   |
|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|
| $x_{i-2}$ | $y_{i-2}$ | $\Delta^1_{-2}$ | $\Delta^2_{-2}$ | $\Delta^3_{-2}$ | $\Delta^4_{-2}$ | $\Delta^4_{-2}$ nach nebenstehendem Schema.   |
| $x_{i-1}$ | $y_{i-1}$ | $\Delta^1_{-1}$ | $\Delta^2_{-1}$ | $\Delta^3_{-1}$ | $\Delta^4_{-1}$ | Das Verfahren werde erläutert an folgendem  |
| $x_i$     | $y_i$     | $\Delta^1_0$    | $\Delta^2_0$    | $\Delta^3_0$    | $\Delta^4_0$    | Beispiel. Eine Luftpumpe evakuiert in $(5 \times 12 =)$ 60 Minuten ein Gefäß von Atmosphärendruck |
| $x_{i+1}$ | $y_{i+1}$ | $\Delta^1_1$    | $\Delta^2_1$    | $\Delta^3_1$    | $\Delta^4_1$    | ein Gefäß von Atmosphärendruck  |
| $x_{i+2}$ | $y_{i+2}$ | $\Delta^1_2$    | $\Delta^2_2$    | $\Delta^3_2$    | $\Delta^4_2$    | Beobachtet wurden für die von 5 zu 5 Minuten wachsenden Zeiten $x$ die in der zweiten Kolonne des |

$y_0 = 760$  mm bis zu einem Druck von  $y_{12} = 200$  mm. Beobachtet wurden für die von 5 zu 5 Minuten wachsenden Zeiten  $x$  die in der zweiten Kolonne des

<sup>1</sup> A. C. DAHLBERG: Milk Plant Monthly 1933, 22, Nr 3, 30—35.  
<sup>2</sup> Vgl. H. v. SANDEN: Praktische Analysis, Bd. 8, S. 2; Bd. 9, S. 2. Leipzig-Berlin 1923.

nebenstehenden Schemas notierten Werte des Drucks  $y$ .

In den letzten Kolonnen sind die ausgeglichenen Ordinatenwerte  $\eta_2, \dots, \eta_{10}$  eingetragen. Zum Beispiel wurden ermittelt:

$$\begin{aligned}\eta_2 &= y_2 - \frac{3}{35} \cdot \Delta_0^4 \\ &= 540 - \frac{3}{35} \cdot 20 \\ &= 540 - 1,7 \\ &= 538,3.\end{aligned}$$

Entsprechend findet man die übrigen Werte der letzten Kolonne. Für die vier Randstellen  $x_0, x_1, x_{11}, x_{12}$  liefert das Verfahren keinen Ausgleich. Die durch die Ausgleichung erhaltenen Punkte ergeben eine glatte Kurve. Der Mangel des Verfahrens liegt darin, daß die beiden

| $x$ | $y$ | $\Delta^1$ | $\Delta^2$ | $\Delta^3$ | $\Delta^4$ | $\eta$ |
|-----|-----|------------|------------|------------|------------|--------|
| 0   | 760 |            |            |            |            | (760)  |
| 5   | 640 | -120       | 20         |            |            | (640)  |
| 10  | 540 | -100       | 10         | -10        | 20         | 538,3  |
| 15  | 450 | -90        | 20         | +10        | -20        | 451,7  |
| 20  | 380 | -70        | 10         | -10        | 10         | 379,1  |
| 25  | 320 | -60        | 10         | 0          | 0          | 320    |
| 30  | 270 | -50        | 10         | 0          | -5         | 270,4  |
| 35  | 230 | -40        | 5          | -5         | 5          | 229,6  |
| 40  | 195 | -35        | 5          | 0          | 0          | 195    |
| 45  | 165 | -30        | 5          | 0          | 0          | 165    |
| 50  | 140 | -25        | 5          | 0          | -5         | 140,4  |
| 55  | 120 | -20        | 0          | -5         |            | (120)  |
| 60  | 100 | -20        |            |            |            | (100)  |

Anfangs- und Endwerte  $y$  als festliegend angenommen wurden, was bei kleineren Versuchsreihen den Wert der Ausgleichung stark beeinträchtigt.

Wenn nun auch eine solche geglättete Kurve es ermöglicht, zu jedem anderen  $x$ -Wert den zugehörigen  $y$ -Wert zu entnehmen, so ist es doch oft, besonders für neu anschließende Untersuchungen, Bestimmung von Differentialquotienten usw. erwünscht, einen ausgleichenden einfachen analytischen Ausdruck zu besitzen, der den Zusammenhang zwischen  $x$  analog darstellt. Am bequemsten für die Rechnung sind die in B. 1 als Interpolationsausdrücke benutzten Polynome, die sich aus einfachen Potenzausdrücken zusammensetzen:

$$\eta = a + b x + c x^2 + \dots + k x^m,$$

worin  $a, b, c \dots k$  zu bestimmende Koeffizienten bedeuten.

Man wird versuchen, mit Polynomen von möglichst niedrigem Grade  $m$  auszukommen. Nach der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt man die Koeffizienten  $a, b, \dots k$  so, daß die Summe der Quadrate der Unterschiede zwischen den beobachteten Ordinatenwerten  $y$  und den ausgeglichenen Werten  $\eta$  ein Minimum wird. Das Verfahren soll an einem Beispiel erläutert werden, bei dem ein Polynom zweiten Grades zugrunde gelegt wird.

Beispiel. Von G. BRUHNS<sup>1</sup> wurde die Ausscheidung von Kupfer aus FEHLINGScher Lösung durch Saccharose mit verschiedenem Invertzuckergehalt in 6 Messungen mittels Thiosulfat bestimmt:

| $x$ | 0    | 1    | 2    | 3    | 4     | 5     |
|-----|------|------|------|------|-------|-------|
| $y$ | 0,81 | 3,12 | 5,37 | 9,41 | 13,34 | 16,96 |

Man stelle die Abhängigkeit zwischen  $x$  und  $y$  ausgleichend durch einen Ausdruck

$$\eta = a + b x + c x^2$$

dar.

Soll  $z = \Sigma(\eta - y)^2 = \Sigma(a + b x + c x^2 - y)^2$  zum Minimum gemacht werden so muß man die partiellen Ableitungen (Differentialquotienten) von  $z$  in bezug auf die zu ermittelnden Koeffizienten  $a, b, c$  gleich 0 setzen. Also:

<sup>1</sup> Vgl. F. W. KÜSTER: Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker. Bearbeitet von A. THIEL, 35.—40. Aufl. S. 157. Berlin und Leipzig 1928.

$$\begin{aligned} \frac{\partial z}{\partial a} &= \Sigma 2 (a + b x + c x^2 - y) = 0 \\ \frac{\partial z}{\partial b} &= \Sigma 2 (a + b x + c x^2 - y) \cdot x = 0 \\ \frac{\partial z}{\partial c} &= \Sigma 2 (a + b x + c x^2 - y) \cdot x^2 = 0. \end{aligned}$$

Diese Gleichungen lassen sich so schreiben:

$$a \cdot n + b \Sigma x + c \Sigma x^2 = \Sigma y, \tag{I}$$

$$a x + b \Sigma x^2 + c \Sigma x^3 = \Sigma x y, \tag{II}$$

$$a x^2 + b \Sigma x^3 + c \Sigma x^4 = \Sigma x^2 y, \tag{III}$$

wobei  $n$  die Anzahl der Beobachtungen bedeutet, hier also gleich 6 ist. Diese drei Gleichungen genügen zur Bestimmung der drei Unbekannten  $a, b, c$ . Das Rechenschema gestaltet sich folgendermaßen:

| $x$         | $x^2$ | $x^3$ | $x^4$ | $y$   | $xy$   | $x^2y$  |         |
|-------------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|
| 0           | 0     | 0     | 0     | 0,81  | 0      | 0       |         |
| 1           | 1     | 1     | 1     | 3,12  | 3,12   | 3,12    |         |
| 2           | 4     | 8     | 16    | 5,37  | 10,74  | 21,48   |         |
| 4           | 16    | 64    | 256   | 9,41  | 37,64  | 150,56  |         |
| 6           | 36    | 216   | 1296  | 13,34 | 80,04  | 480,24  |         |
| 8           | 64    | 512   | 4096  | 16,96 | 135,68 | 1085,44 |         |
| Summenwerte | 21    | 121   | 801   | 5665  | 49,01  | 267,22  | 1740,84 |

Die Gleichungen lauten also

$$6 a + 21 b + 121 c = 49,01 \tag{I}$$

$$21 a + 121 b + 801 c = 267,22 \tag{II}$$

$$121 a + 801 b + 5665 c = 1740,84 \tag{III}$$

$$\text{Aus (I) und (II): } 95 b + 755 c = 191,37 \tag{IV}$$

$$\text{„ (I) „ (III): } 22\ 656 c + 19\ 349 c = 4514,83 \tag{V}$$

$$\text{„ (IV) „ (V): } 128\ 080 c = - 4\ 544,20$$

$$c = - 0,03548.$$

Damit ergibt sich aus IV:

$$95 b = 218,1574; \mathbf{b = 2,2964.}$$

Mit  $b$  und  $c$  ergibt sich aus I:

$$6 a = 5,07868; \mathbf{a = 0,8464.}$$

Das gesuchte Ausgleichungspolynom lautet also:

$$\eta = 0,8464 + 2,2964 x - 0,03548 x^2.$$

Stellt man die hiernach berechneten  $y$ -Werte den beobachteten  $y$ -Werten gegenüber, so ergibt sich folgendes Bild:

|  |      |      |      |      |       |       |
|--|------|------|------|------|-------|-------|
| Prozent Invertzucker ( $x$ ) . . . . . | 0    | 1    | 2    | 4    | 6     | 8     |
| Kubikzentimeter Thiosulfatlösung,      |      |      |      |      |       |       |
| $y$ beobachtet . . . . .               | 0,81 | 3,12 | 5,37 | 9,41 | 13,34 | 16,96 |
| $y$ ausgeglichen . . . . .             | 0,85 | 3,11 | 5,30 | 9,46 | 13,35 | 16,95 |

Liegen die  $x$ -Werte symmetrisch zu ihrem Mittelwert  $\frac{\Sigma x}{n}$ , so kann man die

Rechnung erheblich vereinfachen, indem man als Ausgang (Nullwert) der Zählung der Abscissen, die dann  $x'$  heißen mögen, diesen Mittelwert einführt. Dann verschwinden  $x', x'^3, x'^5, \dots$  aus Symmetriegründen.

Das hier besprochene Ausgleichsverfahren ist natürlich auch anwendbar für die auf einfachem bzw. doppeltlogarithmiertem Papier erhaltenen Kurven, die durch eine Gerade ausgeglichen werden sollen.

Beispiel. W. GRIMMER und H. BENDUSKI<sup>1</sup> vermuten, daß die Wasserstoffionenkonzentration  $y$  in der Milch im allgemeinen<sup>2</sup> in einer gewissen gesetzmäßigen Abhängigkeit zur Titrationsacidität  $x$  steht, und haben dafür die Formel

$$y = y_0 a^x = y_0 \cdot 10^{x \log a}$$

angegeben. Zu 16 verschiedenen Werten  $x$  wurden die in untenstehender Tabelle angegebenen Werte  $y$  beobachtet. Man soll hieraus durch Ausgleich die besten Werte für die Konstanten  $y_0$  und  $a$  ermitteln.

Wir haben hier  $\log y = \log y_0 + x \cdot \log a$ . Die Darstellung auf einfach logarithmischem Papier (vgl. Abb. 4) muß eine Gerade  $\eta = \eta_0 + \mu x$  ergeben, d. h. eine Gerade von der Steigung  $\mu = \log a$ , die auf der Ordinatennachse die Strecke  $\eta_0 = \log y_0$  abschneidet. Die den Beobachtungswerten  $x$ ,  $\log y$  entsprechenden Punkte weichen von dieser Geraden um Beträge  $\eta_0 + \mu x - \log y$  ab, und man muß die Summe der Quadrate dieser Abweichungen zum Minimum machen:

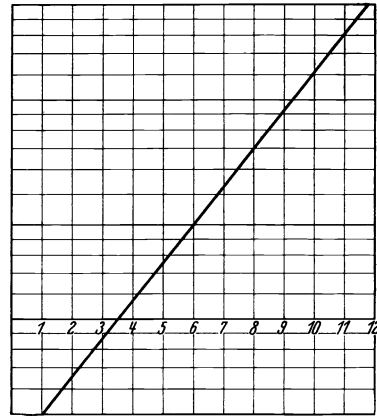


Abb. 4. Beziehung der Wasserstoffionenkonzentration zur Titrationsacidität bei Milch in einfach logarithmischer Darstellung.

$z = \sum(\eta - \log y)^2 = \sum(\eta_0 + \mu x - \log y)^2 = \text{Min.}$ , um die besten Werte für  $\eta_0$  und  $\mu$  zu erhalten. Man muß also die partiellen Differentialquotienten dieses Ausdrucks in bezug auf  $\eta_0$  und  $\mu$  gleich Null setzen:

$$\frac{\partial z}{\partial \eta_0} = \sum 2 (\eta_0 + \mu x - \log y) = 0 \quad \frac{\partial z}{\partial \mu} = \sum 2 (\eta_0 + \mu x - \log y) \cdot x = 0.$$

Diese Gleichungen lassen sich so schreiben:

$$\eta_0 \cdot n + \mu \sum x = \sum \log y \quad \eta_0 \sum x + \mu \sum x^2 = \sum x \log y,$$

wobei  $n$  die Anzahl der Beobachtungen bedeutet, hier also 16 ist. Diese beiden Gleichungen genügen zur Bestimmung der beiden Unbekannten  $\eta_0, \mu$ . Man erhält:

$$\eta_0 = \frac{\sum \log y \sum x^2 - \sum x \log y \sum x}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}, \quad \mu = \frac{-\sum \log y \sum x + n \sum x \log y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}.$$

Das Rechenschema gestaltet sich danach folgendermaßen:

| $x$                 | $x^2$                   | $y \cdot 10^7$ | $\log y$                         | $x \log y$                         |
|---------------------|-------------------------|----------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 5,5                 | 30,25                   | 1,74           | — 6,759 451                      | — 37,176 980                       |
| 6,0                 | 36,00                   | 2,00           | — 6,698 970                      | — 40,193 820                       |
| 6,5                 | 42,25                   | 2,30           | — 6,638 272                      | — 43,148 768                       |
| 7,0                 | 49,00                   | 2,65           | — 6,576 754                      | — 46,037 278                       |
| 7,5                 | 56,25                   | 3,05           | — 6,515 700                      | — 48,867 750                       |
| 8,0                 | 64,00                   | 3,51           | — 6,454 693                      | — 51,637 544                       |
| 8,5                 | 72,25                   | 4,04           | — 6,393 619                      | — 54,345 761                       |
| 9,0                 | 81,00                   | 4,65           | — 6,332 547                      | — 56,992 923                       |
| 9,5                 | 90,25                   | 5,35           | — 6,271 646                      | — 59,580 637                       |
| 10,0                | 100,00                  | 6,16           | — 6,210 419                      | — 62,104 190                       |
| 10,5                | 110,25                  | 7,08           | — 6,149 967                      | — 64,574 653                       |
| 11,0                | 121,00                  | 8,15           | — 6,088 842                      | — 66,977 262                       |
| 11,5                | 132,25                  | 9,38           | — 6,027 797                      | — 69,319 665                       |
| 12,0                | 144,00                  | 10,80          | — 5,966 576                      | — 71,598 912                       |
| 12,5                | 156,25                  | 12,43          | — 5,905 529                      | — 73,819 112                       |
| 13,0                | 169,00                  | 14,27          | — 5,845 576                      | — 75,992 488                       |
| 148,0<br>= $\sum x$ | 1454,00<br>= $\sum x^2$ |                | — 100,836 358<br>= $\sum \log y$ | — 922,367 753<br>= $\sum x \log y$ |

<sup>1</sup> W. GRIMMER u. H. BENDUSKI: Milchw. Forsch. 1929, 7, 76—99.

<sup>2</sup> Abgesehen von einzelnen, noch nicht aufgeklärten Störungen.

Hieraus ergibt sich

$$\eta_0 = \frac{-100,836 \cdot 1454 + 922,368 \cdot 148}{16 \cdot 1454 - 148^2} = \frac{631,44}{85} = -7,4286 = 0,5714 - 8 = \log y_0;$$

$$y_0 = 0,373 \cdot 10^{-7};$$

$$\mu = \frac{100,836 \cdot 148 - 16 \cdot 922,368}{16 \cdot 1454 - 148^2} = \frac{10,36}{85} = 0,1219 = \log a; a = 1,324$$

(womit die von den Verfassern angegebenen Werte  $y_0 = 0,370 \cdot 10^{-7}$ ;  $a = 1,325$  ausreichend übereinstimmen). Trägt man die diesen Werten entsprechende ausgleichende Gerade auf dem einfach logarithmischen Papier ein, so sieht man, daß die den Beobachtungswerten entsprechenden Punkte von ihr kaum merkliche Abweichungen zeigen.

### 3. Korrelationsmethode zum Vergleich zweier natürlicher Funktionen.

Bei vielen Beobachtungsreihen verschiedener Art an demselben oder einem ähnlichen Untersuchungsgegenstände trifft man auf Beziehungen, die sich zwar nicht direkt durch eine feste mathematische Formel ausdrücken lassen, die sich aber doch hinsichtlich der Häufigkeit gleichgerichteter Werte oder umgekehrt einer eigentümlichen Gegensätzlichkeit auszeichnen. So entspricht z. B. einem hohen Proteingehalt des Weizens bzw. des Mehles „im allgemeinen“ eine hohe Backfähigkeit, die wir zahlenmäßig ausdrücken können. Man spricht in diesem Falle von einer positiven Korrelation zwischen Proteingehalt und Gebäckvolumen. Eine ähnliche positive Korrelation besteht zwischen vielen Kennzahlen, z. B. Aschengehalt von Mehlen und elektrischer Leitfähigkeit von Mehlauszügen, Verseifungszahl und REICHERT-MEISLSCHER Zahl bei Butterfett, REICHERT-MEISLSCHER Zahl und Buttersäurezahl, Jodzahl und Lichtbrechung bei Fetten gleicher oder ähnlicher Art. Auch zwischen Fettbestandteilen, z. B. zwischen Buttersäuregehalt und Capronsäuregehalt wurde von uns eine positive Korrelation gefunden. Andere Kennzahlen verhalten sich gerade umgekehrt. Einem hohen Schmelzpunkt oder Erstarrungspunkt eines Fettes entspricht eine niedrige Jodzahl, einem hohen Gehalt der Milch an Chloriden entspricht ein niedriger Milchzuckergehalt usw. Man spricht in diesen Fällen von negativer Korrelation. Daneben gibt es sehr viele Beziehungen, die miteinander verglichen weder positiv noch negativ „korrelieren“, oder bei denen eine Korrelation ohne weiteres nicht erkennbar ist.

Die Feststellung von Korrelationen, besonders auch ihrer zahlenmäßigen Höhe ist nicht nur an sich von großer Bedeutung, sondern kann auch z. B. als ein gutes Mittel zur Einschätzung des Wertes verschiedener Untersuchungsmethoden in bezug auf das zu erreichende Ziel gelten. In anderen Fällen kann der Nachweis des Bestehens einer Korrelation auf sonst schwer erkennbare Beziehungen zwischen den verglichenen Funktionen hinweisen und zur Erforschung dieser den Anstoß geben. Auch der Nachweis des Nichtbestehens einer Korrelation kann oft von Wert sein und bedeuten, daß die verglichenen Zahlen nicht miteinander in Beziehung stehen, also jede als unabhängige Kennzahl gelten kann.

Unter Korrelation versteht man also den Zusammenhang zwischen irgendwelchen veränderlichen Dingen, ohne daß natürlich etwas über die Ursache (die Kausalität) dieses Zusammenhanges gesagt wird. Es erhebt sich nun die Frage, auf welche Weise man eine derartige Korrelation am besten darstellt. Früher pflegte man oft Korrelationen durch Zeichnung von Kurven und den Vergleich solcher Kurven miteinander — ob sie

einen gleichsinnigen oder gegensätzlichen Verlauf zeigen — zu untersuchen. Dieser Weg kam praktisch auf eine Abschätzung nach Augenmaß hinaus und konnte naturgemäß keinen genauen Ausdruck für die Korrelation liefern. Dazu kommt noch, daß bei solchen Kurven, damit man sie überhaupt zeichnen kann, ein Faktor (z. B. die Zeit) mit hereingenommen werden muß, der für die Korrelation selbst zwecklos ist.

Ein besseres Mittel, eine Korrelation zu erkennen, besteht darin, daß man die Abweichungen vom Mittelwert der beiden zu vergleichenden Zahlen als Ordinaten und Abscissen abträgt und dadurch einen Punkt festlegt. Die Maßstäbe der Zeichnung wählt man am besten so, daß ein quadratisches von einem Halbierungskreuz durchschnittenes Diagramm entsteht. Trägt man nun ebenso die Abweichungen vom Mittelwert

in den weiteren Fällen ein, so erhält man eine größere Zahl von Punkten, die entweder über das ganze Feld verstreut liegen bzw. sich „kreisförmig“

anordnen, oder sich in einer bestimmten Richtung ordnen, in einigen Fällen selbst zu einem mehr oder weniger breiten Streifen zusammengedrängt werden. Wenn keine Korrelation vorliegt, wird keine Richtung zu bemerken sein. Diese Richtung wird um so mehr in ein schmales Band übergehen, je enger die Korrelation ist. Nebestehende Abbildungen (Abb. 5 u. 6) geben die Korrelation zwischen Buttersäuregehalt und Capronsäuregehalt einerseits und zwischen Buttersäurezahl und Buttersäuregehalt andererseits bei Butterfett an, wie sie von J. GROSSFELD und A. BATTAY<sup>1</sup> an 32 Proben ermittelt worden sind. Zwischen Buttersäure- und Capronsäuregehalt (Abbildung 5) besteht eine positive Korrelation, wie aus der Anordnung der Punkte von oben rechts nach unten links hervorgeht. Diese Korrelation ist aber weit schwächer als die zwischen Buttersäurezahl und Buttersäuregehalt (Abb. 6), die in Form eines ziemlich schmalen Streifens der

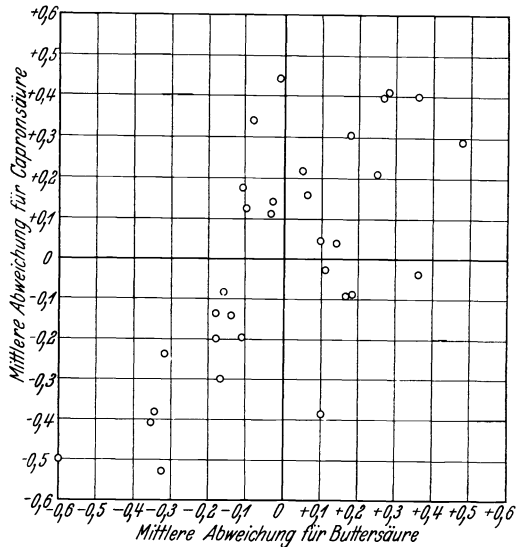


Abb. 5. Korrelation zwischen Buttersäuregehalt und Capronsäuregehalt in Butterfett.

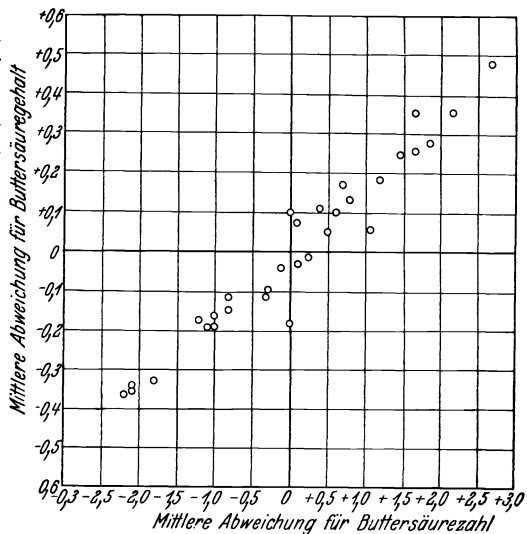


Abb. 6. Korrelation zwischen Buttersäurezahl und Buttersäuregehalt in Butterfett.

<sup>1</sup> J. GROSSFELD u. A. BATTAY: Z. 1931, 62, 99.

Punkte in Erscheinung tritt. — Bei negativer Korrelation würde, wie leicht zu erkennen ist, ein solcher Streifen von oben links nach unten rechts verlaufen.

Indes geben uns diese Zeichnungen auch noch keinen zahlenmäßigen Ausdruck für die Korrelation, es sei denn wieder durch Schätzung der mittleren Breite des Streifens. Ein solcher zahlenmäßiger Ausdruck besteht aber im Korrelationsfaktor, der, wie folgt<sup>1</sup>, abgeleitet wird:

Man berechnet aus einer größeren Zahl von Beobachtungen zunächst den Mittelwert und die einzelnen positiven und negativen Abweichungen von diesem Mittelwert. Nennen wir eine einzelne Abweichung der einen Größe  $x_1$ , die entsprechende der anderen, mit der korreliert werden soll,  $x_2$ , so ist bei positiver Korrelation das Produkt  $x_1 \cdot x_2$  im allgemeinen positiv, bei negativer Korrelation ist die eine Abweichung im allgemeinen der anderen entgegengesetzt, also  $x_1 \cdot x_2$  negativ. Bilden wir nun aus sämtlichen sich entsprechenden Beobachtungen die Produkte  $x_1 \cdot x_2$  und addieren diese, so wird bei positiver Korrelation  $\Sigma x_1 \cdot x_2$  positiv, bei negativer Korrelation negativ werden. Wenn keine Korrelation besteht, wird  $\Sigma x_1 \cdot x_2$  mehr oder weniger 0 werden.

Um  $\Sigma x_1 x_2$  von den Maßeinheiten und der Zahl der Feststellungen unabhängig zu machen, nimmt man, um einen Mittelwert ihrer absoluten Größe zu erhalten, die Quadrate aller Größen  $x_1$  und addiert sie; dividiert man nun durch ihre Anzahl  $n$ , so erhält man das mittlere Quadrat. Die Wurzel daraus,  $\sigma_1$ , gibt die mittlere Größe von  $x_1$  an. In gleicher Arbeitsweise ergibt sich  $\sigma_2$ , also

$$\sigma_1 = \sqrt{\frac{\Sigma x_1^2}{n}}, \quad \sigma_2 = \sqrt{\frac{\Sigma x_2^2}{n}}.$$

Setzt man nun

$$r = \frac{\Sigma x_1 \cdot x_2}{n \sigma_1 \cdot \sigma_2},$$

so ist  $r$  eine von den Maßeinheiten befreite Zahl und proportional der Summe der Produkte. Diese Größe  $r$  nennt man den Korrelationsfaktor (Korrelationskoeffizienten). Wie eine einfache Überlegung zeigt, wird

$r = 1$ , wenn alle  $x_1 = Cx_2$  und  $C$  eine Konstante sind, also die ursprünglichen Kurven sich — abgesehen von dem Verjüngungsfaktor  $C$  — decken,

$r = 0$ , wenn  $x_1$  und  $x_2$  bei genügender Anzahl keine Beziehungen miteinander haben,

$r = -1$ , wenn  $x_1$  und  $x_2$  die größte Gegensätzlichkeit zeigen.

Zahlenwerte von  $r$  zwischen  $+1$  und  $-1$  geben die Größe der Verwandtschaft an, in exakter Weise jedoch erst, wenn unendlich viele Feststellungen gemacht worden sind.

Bei praktischen Arbeiten kommt indes nur eine endliche Anzahl von Beobachtungen in Frage, was zur Folge hat, daß unser Korrelationsfaktor eine gewisse Unsicherheit besitzt, mit einem „wahrscheinlichen Fehler“ behaftet ist. Dieser wahrscheinliche Fehler, den wir  $f$  nennen, läßt sich nach PEARSON nach der Gleichung

$$f = \frac{0,674(1-r^2)}{\sqrt{n}}$$

berechnen.  $f$  ist also um so größer, je kleiner die Zahl der Beobachtungen und je kleiner der Korrelationsfaktor  $r$  ist.

Man pflegt bei Angabe des Korrelationsfaktors  $r$  die Größe von  $f$  als Maß für die Sicherheit hinzuzufügen. Im allgemeinen wird gefordert, daß  $f$  nicht

<sup>1</sup> Vgl. F. M. EXNER: Die Korrelationsmethode. Jena 1913.

größer als  $r/6$  sein darf, wenn  $r$  noch ein verlässlicher Wert sein soll. Doch kommen auch Fälle vor, bei denen die Korrelation  $r$  sich als das Ergebnis des Zufalles erweist, wenn  $f$  noch kleiner als  $r/6$  ist.

Es ist nun ein Leichtes, auch für unsere Beziehungen zwischen Buttersäuregehalt und Capronsäuregehalt bzw. zwischen Buttersäurezahl und Buttersäuregehalt  $r$  auszurechnen<sup>1</sup>; so wird erhalten:

|   |   |
|---|---|
| Korrelation zwischen Buttersäuregehalt<br>und Capronsäuregehalt<br>$\Sigma x_1 \cdot x_2 = 1,4929$<br>$\sigma_1 = 0,2780$ $\sigma_2 = 0,2414$<br>$r = 0,70$ $f = \pm 0,060$ | Korrelation zwischen Buttersäurezahl<br>und Buttersäuregehalt<br>$\Sigma x_1 \cdot x_2 = 9,607$<br>$\sigma_1 = 0,241$ $\sigma_2 = 1,40$<br>$r = 0,89$ $f = \pm 0,026$ |
|---|---|

Im ersteren Falle beträgt der wahrscheinliche Fehler etwa  $1/12$ , im anderen Falle etwa  $1/34$  des Korrelationsfaktors. Andererseits zeigt der Vergleich, daß eine mäßige Erhöhung des Korrelationsfaktors bereits eine viel stärkere Korrelation anzeigt, als die Zeichnung erkennen läßt. Daraus folgt aber auch umgekehrt, daß ein Sinken des Korrelationsfaktors, etwa unter 0,5, anzeigt, daß praktisch keine brauchbare Korrelation mehr vorhanden ist.

Wenn nun weiter mit Hilfe des Korrelationsfaktors aus einer gegebenen Größe auf die andere Größe geschlossen werden soll, so faßt man die eine Größe  $x_1$  als lineare<sup>1</sup> Funktion der andern auf, entsprechend einer allgemeinen Gleichung

$$x_1 = bx_2 + \delta.$$

Der Wert  $b$  hat dann für alle Wertpaare die gleiche Größe.  $\delta$  hat für jedes Paar einen anderen Wert. Es bedeutet den Fehler, den wir machen, wenn wir allgemein

$$x_1 = bx_2$$

setzen. Letztere Gleichung stellt die durchschnittliche Beziehung, die Korrelation aller Werte  $x_1$  zu den Werten  $x_2$  dar. Man nennt sie Regressionsgleichung<sup>2</sup>. Die Gleichung wird um so genauer der Wirklichkeit entsprechen, je kleiner  $\delta$  wird. Eine genauere Betrachtung ergibt, daß

$$b = r \frac{\sigma_1}{\sigma_2}$$

zu setzen ist. Man nennt  $b$  den Regressionskoeffizienten.

Bleiben wir bei unserem Beispiel der Korrelation zwischen Buttersäurezahl und Buttersäuregehalt, so ist also in unserem Falle

$$b = r \frac{\sigma_1}{\sigma_2} = 0,89 \frac{0,241}{1,40} = 0,15;$$

$$x_1 = 0,15 x_2.$$

Liegt also die Buttersäurezahl um 1 über dem Mittelwert, so wird wahrscheinlich der Buttersäuregehalt um 0,15 über dem Mittelwert liegen.

In dem bei statistischen Berechnungen sehr häufigen Fall, daß nicht nur zwei veränderliche Größen, sondern drei oder mehr  $x_1, x_2, x_3 \dots$  miteinander in Beziehung stehen, kann man fragen, wie genau  $x_1$  von den anderen Größen bestimmt wird. Bei dieser Erweiterung der Korrelationsmethode spricht man von partieller Korrelation<sup>3</sup>. Diese Methode geht von den gewöhnlichen Korrelationsfaktoren aus und untersucht zunächst den Einfluß der Variablen auf  $x_1$ , indem sie partielle Korrelationsfaktoren aufstellt. Da die Größen  $x_2, x_3 \dots$

<sup>1</sup> Bezüglich der einzelnen Zahlenwerte von  $x_1$  und  $x_2$  sei auf die Originalstelle Z. 1931, 62, 119, verwiesen.

<sup>2</sup> Als einfachste Voraussetzung.

<sup>3</sup> C. U. YALE: Introduction to the Theory of Statistics. London: Ch. Griffin & Co. 1912.



meist voneinander selbst nicht unabhängig sind, so fragt man zunächst, wie die Korrelation zwischen  $x_1$  und  $x_2$  beschaffen ist, wenn  $x_3, x_4 \dots$  Null sind. Sodann kann man  $x_1$  als Funktion der Größen  $x_2, x_3 \dots$  ausdrücken, indem man

$$x_1 = b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + \dots$$

setzt. Die Faktoren  $b_2, b_3, b_4 \dots$  werden ähnlich wie oben berechnet.

Über weitere Möglichkeiten zur graphischen Darstellung von Korrelationen, das sog. Korrelationsfeld, sowie die Korrelationsfläche, welche die Umschreibung durch die 1%-Grenzlinie ergibt, vgl. A. BECKEL<sup>1</sup>, der auch die Berechnung des Korrelationsfaktors daraus zeigt.

Nach BECKEL haben die einzelnen Nahrungsmittel jeweils charakteristische Lage und Form der Korrelationsflächen, z. B. Fleisch für Wasser und organisches Nichtfett, Himbeer-Rohsaft für Asche und Alkalität, Milch für Brechung des Serums und Chlorgehalt. Durch willkürliche Eingriffe, z. B. durch Wässerung wird das natürliche Gefüge der Korrelationsfläche geändert.

<sup>1</sup> A. BECKEL: Z. 1934, 68, 41.

# Biologische Methoden.

## Verdaulichkeit der Lebensmittel.

Von

Professor **DR. A. BÖMER**-Münster i. W.

Unter der Verdaulichkeit oder Ausnutzung der Lebensmittel versteht man die prozentuale Angabe — Verdaulichkeits- oder Ausnutzungskoeffizienten — derjenigen Nährstoffmengen, welche beim Genuß in den Verdauungsorganen ausgenutzt, d. h. entweder im Körper angesetzt oder verbrannt werden bzw. werden können. Man bestimmt die Verdaulichkeit oder Ausnutzung der Lebensmittel aus der Differenz der flüssigen und festen Einnahmen und Ausgaben des Körpers. Hierdurch werden aber nicht diejenigen Stoffmengen ermittelt, welche dem Körper wirklich zugute kommen, d. h. von ihm in der Form von Fleisch und Fett angesetzt werden, und diejenigen, welche zur Erhaltung des Körpers und seiner Leistungen verbrannt werden (siehe den Anhang auf S. 1466).

Die Bestimmung der Verdaulichkeit der Lebensmittel geschieht teils durch Verdauungsversuche am Menschen selbst, teils künstlich durch Behandlung der Lebensmittel mit Verdauungsenzymen außerhalb des Körpers. Darüber, welches dieser beiden Verfahren die brauchbarsten Ergebnisse liefert, bestehen Meinungsverschiedenheiten. Bisher war man allgemein der Ansicht, daß der Verdauungsversuch am Menschen selbst — oder am Hunde, dessen Verdauungsorgane den menschlichen ähnlich sind — angestellt werden müsse, und infolgedessen ist eine große Zahl von solchen Versuchen mit den wichtigsten Lebensmitteln angestellt worden. Diesen Versuchen haften aber, wie unten gezeigt werden wird, erhebliche Mängel an. Infolgedessen tritt H. STEUDEL<sup>1</sup> neuerdings dafür ein, daß die künstliche Verdauung mit den Verdauungsenzymen außerhalb des Körpers, die auch früher schon vielfach angewendet wurde, brauchbarere Ergebnisse liefert und daher allgemein angewendet werden sollte.

### I. Verdauungsversuche am Menschen.

Solche Verdauungsversuche am Menschen sind in ihrem Prinzip zwar sehr einfach, in der praktischen Ausführung sind sie aber mit großen Schwierigkeiten und Mängeln verbunden.

#### 1. Schwierigkeiten und Mängel der Verdauungsversuche.

a) **Einförmigkeit der Kost.** Zunächst machen solche Versuche den tagelangen ausschließlichen Genuß eines einzelnen Lebensmittels notwendig. Der erwachsene Mensch kann aber ein einzelnes Lebensmittel kaum einige Tage ohne Widerstreben verzehren, selbst wenn gleichzeitig Getränke, wie Bier, Wein oder Mineralwasser gestattet werden. Sodann aber ist auch die genaue Sammlung

<sup>1</sup> H. STEUDEL: Zeitschr. ges. exp. Medizin 1935, **95**, 580.

des dem betreffenden Lebensmittel oder der Nahrung entsprechenden Kotes schwierig. An abwechslungsreiche Kost gewöhnte Menschen verschmähen mitunter schon nach wenigen Mahlzeiten ein und dasselbe Lebensmittel. Es eignen sich daher zu solchen Versuchen zunächst nur Menschen, die an einfache und sparsame Kost gewöhnt sind und dabei gute Verdauungsorgane besitzen.

In anderen Fällen kann man, wenn man die Ausnutzungsfähigkeit verschiedener Nahrungsmittel (z. B. verschiedener Brot- oder Mehlsorten, verschiedener Gemüse usw.) vergleichend nebeneinander prüfen will, in der Weise verfahren, daß man eine gleiche geringe Menge eines anderen zusagenden Lebensmittels (Fleisch oder Milch), dessen fast völlige Ausnutzungsfähigkeit erwiesen ist, zulegt und neben diesem in der überwiegenden Menge das vergleichsweise zu prüfende Lebensmittel verabreicht. Als anregende Mittel kann man je nach der Art des zu prüfenden Lebensmittels auch Fleischsuppe, Kaffee, Bier oder Wein genießen lassen.

Selbstverständlich muß auch das Gewicht der Versuchspersonen (ohne Kleidung) vor und nach dem Versuche durch eine hinreichend genaue Waage kontrolliert werden.

**b) Abgrenzung des Kotes.** Diese bereitet große Schwierigkeiten. Bei Tieren, die tagaus tagein dasselbe Futter verzehren, hält die Abgrenzung nicht schwer; man füttert die Tiere (Wiederkäuer, Schweine, Pferde usw.) 7—10 Tage mit dem zu prüfenden Futtermittel, bis man sicher sein kann, daß aller Inhalt der Verdauungsorgane von einem vorhergehenden Futter entfernt ist und der entleerte Kot nunmehr dem zu prüfenden Futtermittel entspricht; man sammelt und wägt von da an den Kot täglich, indem man die Fütterung in derselben Weise noch 7—10 Tage fortsetzt. Man erhält so genügend richtige Durchschnittswerte für die dem täglich verzehrten Futter entsprechende Kotmenge.

Dieses Verfahren läßt sich aber beim Menschen nicht anwenden, weil er, wie schon gesagt, eine einseitige Nahrung nur wenige Tage erträgt. Deshalb sucht man hier durch ein Vor- und Nachnahrungsmittel, das einen sehr kennzeichnenden Kot liefert, den dem zu prüfenden Nahrungsmittel entsprechenden Kot abzugrenzen. J. RANKE verwendete für diesen Zweck Preißelbeeren, deren Hüllen mit dem Kot wieder abgehen und darin leicht aufgefunden werden können. Indes hat sich dieses Mittel, weil die Beerenteile an den Darmwandungen hängen bleiben, nicht bewährt<sup>1</sup>. Dagegen ist nach M. RUBNER'S Vorgange reine Milchnahrung für den Zweck sehr geeignet. Der Kot nach Milchgenuß ist weiß bis hellgelb<sup>2</sup> und bildet, wenn nicht Diarrhöen<sup>3</sup> danach eintreten, feste, knollige, Maiskolben vergleichbare Massen, die sich wie Seife schneiden und vom Kot nach Genuß anderer Nahrung scharf abgrenzen lassen.

Um z. B. die Ausnutzung einer während 3 Tagen gegebenen Fleischmenge zu erfahren, reicht M. RUBNER<sup>4</sup> am Tage vor Beginn des Versuches etwa 2 l — nicht unter 1,5 l und nicht über 2,5 l — Milch, läßt zwischen der Milchaufnahme und dem Beginn der eigentlichen Versuchsreihe eine Pause von 16—24 Stunden eintreten, um die Vermischung der Kotsorten zu vermeiden; 15 Stunden vor Abschluß der Versuchsreihe wird die letzte Mahlzeit eingenommen, worauf dann gewöhnlich 6 Stunden nach dem Abschluß, also 21 Stunden

<sup>1</sup> Beim Hunde kann man den Kot auch durch Knochen abgrenzen; die Hunde werden 12—24 Stunden vor Beginn und nach Abschluß einer Versuchsreihe mit Knochen gefüttert und liefern dann den kennzeichnenden Knochenkot von weißer krümeliger Beschaffenheit. Die für die Kotabgrenzung empfohlenen Korkstückchen oder Kohlenpulver haben sich nicht bewährt.

<sup>2</sup> Der Kot nach Fleischgenuß ist dunkelbraun, der Eierkot goldgelb, der Blutwurstkot schwarz, der nach gemischter Kost hellbraun.

<sup>3</sup> Diarrhöen treten häufig nach Aufnahme von kalter, nicht von gekochter oder warmer Milch auf; auch ist meistens mit einer einmaligen dünnflüssigen Entleerung die Erscheinung verschwunden.

<sup>4</sup> M. RUBNER: Zeitschr. Biol. 1879, 15, 115.

nach der letzten Mahlzeit, wieder Milch genommen wird. Dadurch schließt man den dunklen Fleischkot — bzw. den nach anderer Kost erhaltenen Kot — zwischen den weißen, leicht erkennbaren Milchkot ein. Folgende Tabelle aus den Versuchen RUBNERS möge die Versuchsanordnung erläutern:

| Tag                  | Speise    | Zeit           | Kot   |  |
|----------------------|-----------|----------------|---|--|
|                      |           |                | Menge   |  |
| Vortag . . 12. Febr. | Milch     | —              | 0   |  |
| Versuchstage         | 13. Febr. | —              | 0   |  |
|                      | 14. Febr. | 4 Uhr nachm.   | Gemischter Kot, Milchkot (10,6 g trocken) und erster Brotkot (14,8 g trocken) |  |
|                      | 15. Febr. | 10 Uhr vorm.   |   |  |
| Nachtage             | 16. Febr. | 12 Uhr mittags | } Brotkot (28,5 g) und Milchkot<br>Milchkot und gemischter Kot                |  |
|                      | 17. Febr. | —              |   |  |
|                      | 18. Febr. | —              |   |  |

Wie man sieht, erscheinen die letzten Reste der genossenen Nahrung — hier Brot — im Kot erst am 2. Tage nach der letzten Aufnahme.

Wenn es sich daher ermöglichen läßt, daß das auf Verdaulichkeit zu prüfende Nahrungsmittel 4 oder besser 5 Tage lang — unter Mitverwendung von den genannten, die Verdaulichkeit nicht beeinflussenden Zusätzen oder Getränken — genossen wird, so kann man auch ohne wesentlichen Fehler in der Weise verfahren, daß man die Nahrung erst 2 oder 3 Tage verabreicht, ohne den während dieser Vortage ausgeschiedenen Kot zu berücksichtigen, dann dieselbe Nahrung noch 2 Tage weiter verabreicht und den Kot erst an den letzten beiden Versuchstagen, also am 3. und 4., oder am 4. und 5. Tage nach Beginn des Versuches sammelt und wägt.

Von anderer Seite<sup>1</sup> sind auch zur Abgrenzung des Kotes die Farbstoffe Carmin und Indigocarmin empfohlen worden.

e) **Mängel der Ergebnisse.** Selbstverständlich müssen zu den Verdauungsversuchen gesunde Personen mit normal wirkenden Verdauungsorganen ausgewählt werden, und zwar, da auch die Organe solcher Personen noch verschiedene Verdauungskraft besitzen können, am besten mehrere Personen. Aber auch, wenn diese Bedingungen erfüllt sind, bleibt eine Unsicherheit der Verdaulichkeitsergebnisse in folgender Richtung bestehen:

α) Der Kot besteht nicht lediglich aus den unverdauten Bestandteilen der Nahrung, sondern er enthält auch mehr oder weniger unkontrollierbare Beimengungen von Darmsekreten, die aus Stickstoffverbindungen und ätherlöslichen Stoffen bestehen. Infolgedessen dürfte die Verdaulichkeit von Protein und Fett auch mehr oder weniger größer sein, als durch den Verdauungsversuch sich ergibt. Andererseits können nach H. STEUDEL infolge von Darmgärung und Fäulnis die Ergebnisse des Verdauungsversuches auch, namentlich hinsichtlich der Kohlenhydrate, günstiger erscheinen, als sie in Wirklichkeit sind.

β) Die Verdaulichkeit eines Lebensmittels wird beim Verdauungsversuch am Menschen auch dadurch beeinflusst, in welcher Kombination mit anderen Lebensmitteln das betreffende Lebensmittel verzehrt wird. Wird ein Lebensmittel, z. B. Brot, Kartoffeln, Gemüse usw. allein verzehrt, so zeigt es eine geringere Verdaulichkeit, als wenn es in Kombination mit anderen Lebensmitteln, z. B. Fleisch, verzehrt wird<sup>2</sup>. Infolgedessen sind die Ergebnisse solcher Verdauungsversuche von Fall zu Fall verschieden und nicht reproduzierbar.

<sup>1</sup> R. FERRARI: Pflügers Arch. 1932, 230, 215.

<sup>2</sup> Vgl. P. ALBERTONI und F. ROSSI: Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 1908, Suppl.-Bd., S. 29. — R. FERRARI: Pflügers Arch. 1932, 230, 215. — J. M. VOIGT: Pflügers Arch. 1934, 234, 570.

## 2. Ausführung der Verdauungsversuche.

α) Menge und Zusammensetzung der Nahrung. Bei der Ermittlung der Menge der eingenommenen Nahrung ist es wesentlich, daß die Versuchsperson die ihr zugewogene Nahrung auch vollständig verzehrt; geschieht dies nicht, so müssen auch die Reste gesammelt und untersucht werden.

α) Probenahme. Von großer Wichtigkeit ist es, daß jedesmal eine gute Durchschnittsprobe der Nahrung für die Analyse gezogen wird.

Getränke, wie Bier, Wein, Mineralwasser usw. lassen sich von gleicher Beschaffenheit stets in solchen Mengen erhalten, daß sie für den ganzen Versuch ausreichen. Sie brauchen daher nur einmal untersucht zu werden.

Milch, Fleischbrühe Mehlsuppen, breiartige Speisen, gekochte Gemüse usw. schwanken dagegen täglich im Gehalt, je nach der Mischung und Kochdauer. Hiervon müssen also täglich Proben entnommen und untersucht werden. Da die täglich zubereiteten Mengen verschieden ausfallen werden, so müssen die für die Untersuchung zu entnehmenden Proben stets im gleichen Verhältnis zu den zubereiteten Mengen stehen. Zu dem Zweck verfährt man zweckmäßig in der Weise, daß man morgens — oder bei Gemüsen auch abends vorher — eine solche Menge der Flüssigkeit bzw. des Breies zubereitet und kocht, daß sie für den Versuchstag mehr als ausreicht, nach dem Erkalten das Gewicht ermittelt und nun jedesmal  $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{10}$  der zubereiteten Speise für die Untersuchung nach gehörigem Durchmischen entnimmt; die verbleibenden  $\frac{4}{5}$  oder  $\frac{9}{10}$  der Speise werden dann für jede Mahlzeit (3—5mal) unter Bedecken in heißem Wasser aufgewärmt und davon aliquote Teile je nach Bedürfnis genossen, indes so, daß bei der letzten Mahlzeit die letzten Reste verzehrt werden. Geschieht dieses nicht, so müssen die Reste zurückgewogen und, weil sie infolge Wasserverdunstung einen höheren Trockensubstanzgehalt als die ganze Speise am Morgen haben werden, für sich zur weiteren Untersuchung gesammelt werden. Zur Erläuterung möge folgendes Beispiel dienen:

|             | Zubereitete Menge<br>Speise (Gemüse) | Davon $\frac{1}{5}$ für<br>die Untersuchung | Verzehrt den<br>Tag über | Reste  |
|-------------|--------------------------------------|---|--------------------------|--------|
| 1. Tag. . . | 1735,0 g                             | 347,0 g                                     | 1332,5 g                 | 55,5 g |
| 2. Tag. . . | 1794,4 „                             | 338,9 „                                     | 1343,2 „                 | 12,3 „ |

usw. für die noch folgenden 2 oder 3 Versuchstage.

Die täglich abgewogenen Mengen breiiger Speisen werden in Porzellanschalen oder emaillierte flache Eisenschalen gegeben und auf dem Wasserbade oder im Lufttrockenschrank bei 40—50° tunlichst schnell eingedampft. Hat man von den zubereiteten Speisen stets die Anteile für die Untersuchung jeden Tag in dem gleichen Verhältnis ( $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{10}$ ) abgewogen, so kann man die abgewogenen Mengen von vornherein oder nach dem Wägen im lufttrockenen Zustande zusammengeben und zusammenverarbeiten. Sind die  $\frac{1}{5}$  Anteile an den einzelnen Versuchstagen nicht zusammengegeben, sondern jeder Anteil für sich vorgetrocknet und hat man z. B. gewogen:

| Speise      | 1. Tag   | 2. Tag   | 3. Tag   | 4. Tag   | 5. Tag   | Zusammen |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Frisch . .  | 1332,5 g | 1343,2 g | 1290,3 g | 1405,4 g | 1350,6 g | 6722,0 g |
| Lufttrocken | 199,8 „  | 206,5 „  | 185,6 „  | 196,4 „  | 204,5 „  | 992,8 „  |

so werden die 992,8 g lufttrockne Speise nach dem Mischen zusammen vermahlen. Man kann aber auch die jedesmaligen  $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{10}$  Anteile von vornherein zusammengeben, zusammen trocknen und zuletzt zusammen wägen.

Feuchtfeste Lebensmittel, wie Fleisch, Wurst, Käse, Eier, Brot, Kuchen, Kartoffeln, Gemüse, Obst, haben, besonders was den Wassergehalt anbelangt, eine mehr oder weniger wechselnde Zusammensetzung; es müssen daher Proben von den täglich verzehrten Mengen entnommen werden; aber auch hier kann man, wenn man die Proben jedesmal in demselben Verhältnis (sei es  $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{10}$  g) von der zubereiteten Menge entnimmt, die täglich abgewogene Menge wie bei breiartigen Speisen zusammengeben und schließlich die gesammelten und vorgetrockneten Proben zusammen verarbeiten und als Durchschnittsprobe untersuchen.

Von den täglich zugemessenen Eiern werden zwei Stück von mittlerer Größe verwendet, gewogen, der Inhalt in eine gewogene Porzellan- oder emaillierte Eisenschale entleert, gewogen und auf einem Wasserbade eingetrocknet<sup>1</sup>. Die eingetrocknete Masse wird zusammen zurückgewogen, fein zerhackt oder verrieben und dann weiter untersucht.

<sup>1</sup> Man kann das Gewicht des Eierinhalts auch in der Weise ermitteln, daß man die entnommenen Eier wägt, in die Porzellanschale usw. entleert und die Eierschalen zurückwägt. Auf diese Weise kann man den Inhalt der täglich entnommenen Eier immer in dieselbe Porzellanschale entleeren und im Wasserbade weiter trocknen bis zur Beendigung des Versuches. Auch kann man, da der Wassergehalt der Eier beim Kochen sich nur unwesentlich ändert, die entnommenen Eier sehr hart kochen und das Gewicht des Inhaltes nach dem Kochen ermitteln.

Zu Fleischversuchen wird man zweckmäßig von anhängendem Fett tunlichst befreite Stücke nehmen. Man wägt hiervon  $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{2}$  mehr ab, als für den Verzehr in Aussicht genommen ist, bereitet diese in gewünschter Weise (roh gehackt, gekocht, gedämpft oder gebraten) zu, wägt und nimmt von den zubereiteten Stücken an verschiedenen Stellen im ganzen  $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{1}{2}$  des Gewichtes für die chemische Untersuchung; diese wird entweder täglich ausgeführt und aus den an den einzelnen Tagen gewonnenen Ergebnissen das Mittel genommen, oder man bewahrt die täglich für die Untersuchung entnommenen Proben in gut schließenden Porzellan- oder Blechgefäßen auf, auf deren Boden sich Formaldehyd oder Chloroform befindet, die einer Zersetzung des Fleisches während der mehrtägigen Aufbewahrung vorbeugen, aber die chemische Untersuchung nicht beeinträchtigen. Die gesamten Proben Fleisch werden dann am Schlusse des Versuches zusammen in einer Fleischhackmaschine fein zerhackt und hiervon aliquote Teile untersucht. Hat man sehr mageres Fleisch, so kann man es nach dem Zerschneiden in kleinere Stückchen gleich in Schalen trocknen, die lufttrockenen Rückstände am Schlusse des Versuches nach dem Wägen mahlen und so weiter untersuchen. Enthalten die Fleischstücke aber viel anhängendes Fett, so ist es kaum möglich, durch direkte Verarbeitung der Stücke eine gute Durchschnittsprobe für die Untersuchung zu erhalten. Dann trennt man äußerlich anhängendes Fett möglichst vollständig ab, ermittelt von ihm wie von dem reinen Fleisch das Gewicht und untersucht beide getrennt für sich.

Wurst und sonstige Fleischaufbewahrungsbwaren besitzen durchweg eine gleichmäßigere Zusammensetzung als Fleisch; auch halten sie sich für die Versuchstage genügend gut, so daß von der für jeden Versuch ausgewählten Gesamtmenge nur aus verschiedenen Stücken bzw. an verschiedenen Stellen Proben entnommen zu werden brauchen, um einen guten Durchschnitt zu erhalten.

Käse. Auch eine und dieselbe Käsesorte besitzt eine genügend gleichmäßige Zusammensetzung bzw. Haltbarkeit, um durch eine einzige Entnahme bei Beginn des Versuches eine gute Durchschnittsprobe erhalten zu können. Verwendet man kleinere Käse, die ohne Abfall verzehrt werden, so entnimmt man einem größeren Vorrat etwa 10—15 Stück, wägt und untersucht sie wie üblich; den für den ganzen Versuch ausreichenden Vorrat gibt man in ein verschlossenes Blechgefäß und bewahrt ihn in einem kühlen Raum auf, so daß ein Wasserverlust ausgeschlossen ist. Die täglich verzehrte Menge wird durch besondere Wägung festgestellt. In ähnlicher Weise verfährt man mit Käse in großen Laibformen. Hiervon schneidet man je nach der Größe der letzteren ein Kreisteilstück (Segment) von  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  oder  $\frac{1}{16}$  (im ganzen etwa 500—1000 g) heraus, entrindet, wägt und untersucht in üblicher Weise. Für den täglichen Verzehr werden ebenfalls Segmente der Käseläibe abgewogen und entrindet verabreicht. Die Aufbewahrung geschieht wie bei den kleinen Käsen.

Brot und ähnliche Gebäcke werden zweckmäßig täglich frisch zubereitet, und zwar doppelt in der zugeachteten Gewichtsmenge; die eine Hälfte dient zur chemischen Untersuchung, die andere zum Verzehr; es empfiehlt sich, nur so viel Brot bzw. Gebäck zuzubereiten, daß die Hälfte im Tage genau verzehrt wird; hat man zwei Laibe Brot gebacken, so durchteilt man beide und nimmt je die Hälfte für die Untersuchung und zum Verzehr. Die zur Untersuchung bestimmte Hälfte (bzw. Hälften) wird in Scheiben geschnitten und in üblicher Weise bei 40—50° vorgetrocknet. Wenn man in dieser Weise verfahren hat, so kann man die von jedem Tag verbleibenden lufttrockenen Proben am Schlusse zusammengeben, gemeinschaftlich wägen, vermahlen und als eine richtige Durchschnittsprobe weiter untersuchen. Verbleiben von dem Brot oder Gebäck unverzehrt Rückstände, so müssen diese für sich gesammelt und wegen des im Tage eintretenden Wasserverlustes für sich untersucht und deren Trockensubstanz von der des zugewogenen Brotes abgezogen werden.

Lufttrockene Lebensmittel (Trockenobst, Trockengemüse usw.) lassen sich in Blechbehältern in trockenen Räumen so aufbewahren, daß sie für den ganzen Versuch ihren Wassergehalt bewahren, weshalb von ihnen für die Untersuchung auch nur einmal eine gute Durchschnittsprobe entnommen zu werden braucht.

Liefere die Lebensmittel Abfälle, die nicht mitgegessen werden (z. B. Kerne, Steine, Mark usw.), so werden diese abgetrennt und nur der eßbare Teil untersucht; selbstverständlich darf dann für die Abwägung der für den täglichen Genuß bestimmte Menge auch nur der eßbare, nach Entfernung der Abfälle verbleibende Anteil verwendet werden. Werden diese Nahrungsmittel nicht roh (wie etwa Zwieback, Trockenobst), sondern gekocht (wie Gemüse) genossen, so entnimmt man die Proben für die chemische Untersuchung wie oben (S. 1460) angegeben ist.

β) Untersuchung. Diese erfolgt nach den bei den einzelnen Lebensmitteln üblichen Verfahren. Bei den wenig haltbaren wasserreichen Lebensmitteln ist durch rechtzeitiges Vortrocknen (S. 551) ihr Verderben zu verhindern. Die Untersuchung erstreckt sich in der Regel auf die Bestimmung von Wasser, Stickstoffsubstanz, Fett, stickstofffreie Extraktstoffe, Rohfaser und Asche.

**Verbrennungswärme (Caloriengehalt).** Diese kann man direkt bestimmen durch Verbrennung der Substanz in einem Calorimeter (S. 122). Vielfach aber berechnet man die Verbrennungswärme aus den Ergebnissen der chemischen Analyse und legt dabei die von M. RUBNER (Bd. I, S. 1197) angegebenen Verbrennungswärmen zugrunde, nämlich in runden Zahlen für 1 g.

| Proteine | Fett | Kohlenhydrate |
|----------|------|---------------|
| 4100     | 9300 | 4100 cal      |

Diese Berechnung ist bei Fetten mit 9200—9500 cal und Kohlenhydraten (Zucker, Stärke) mit 3700—4200 cal einfach und ziemlich einwandfrei, nicht dagegen bei den Proteinen, weil diese im Körper nicht wie im Calorimeter vollständig zu Stickstoff, Kohlendioxyd und Wasser verbrannt werden und damit 5500—5900 cal liefern, sondern zum Teil als Harnstoff usw. den Körper im Harn verlassen. Nach M. RUBNER hat sich die von ihm vorgeschlagene mittlere Verbrennungswärme von 4100 cal bewährt.

Da aber die Nährstoffe bzw. Lebensmittel im Körper nicht vollständig verbrannt werden, sondern ihr unverdaulicher Teil im Kot ausgeschieden wird, so gibt man bei den Lebensmitteln die Verbrennungswärme vielfach in Reincalorien an und bezeichnet damit die Verbrennungswärme des verdaulichen Teiles der Lebensmittel, der dem Körper wirklich zugute kommt. Bei den aus dem Tierreich stammenden Lebensmitteln, ferner bei Zucker, Stärke und Pflanzenfetten weicht der Gehalt an Reincalorien nur wenig von dem Gesamt-Caloriengehalt (Rohcalorien) ab; dagegen ist der Unterschied bei rohfaserreichen Lebensmitteln (grobem Brot, Obst, Gemüse usw.) je nach deren Rohfasergehalt mehr oder weniger beträchtlich (z. B. nach M. RUBNER bei Vollkornbrot 24,3%).

**b) Sammlung und Untersuchung des Kotes.** Zum Auffangen des Kotes bedient sich W. PRAUSNITZ<sup>1</sup> einer besonderen Vorrichtung.

Diese Vorrichtung besteht aus einer 1 m langen, 32 cm hohen und 43 cm breiten Bank, auf der in der Mitte der beiden Seiten zwei 35 cm lange, 8 cm dicke, 15 cm hohe, oben abgerundete Holzleisten aufgesetzt sind, zwischen welchen das zur Aufnahme des Kotes bestimmte Gefäß, eine emaillierte rechteckige Schüssel von 58 cm Länge, 8 cm Höhe und 27 cm Breite, auf der Bank nach vorn und nach rückwärts geschoben werden kann.

Um den vor und nach dem Versuch durch den Milchgenuß oder auf sonstige Weise (S. 1458) erhaltenen Abgrenzungskot genau von dem der Versuchsnahrung entsprechenden Kot trennen zu können, muß dafür gesorgt werden, daß die entleerten Teile nicht aufeinander, sondern in Strängen (wurstartig) hintereinander zu liegen kommen. Dieses erreicht man am besten dadurch, daß man während der Entleerung des Kotes das Gefäß mit der Hand langsam hin oder her bewegt. Wenn der Kot weich und breiartig ist, so kann die Abgrenzung erschwert werden; bei fester Beschaffenheit bietet sie dagegen keine Schwierigkeit. Man entfernt mittels eines Hornmessers die vor und nach dem Genuß der Versuchsnahrung entleerten Kotanteile mitsamt dem Milchkot und läßt nur die zwischen den beiden Milchkoten befindlichen Kotanteile in der Schale zurück; diese werden in der Schale, deren Leergewicht vorher festgestellt ist, gewogen und in dieser bei 40—50° vorgetrocknet und nach S. 551 weiter behandelt. Wenn der der Versuchsnahrung entsprechende Kot erst am 3. und 4. Tage voll entleert wird, so werden diese Mengen nach Entfernung des Milchkotes und des darauffolgenden Kotes ebenfalls für sich gesammelt, gewogen, zu dem ersten bzw. zu dem ersten und mittleren Anteile gegeben und mit diesem zusammen vorgetrocknet und weiter behandelt.

Besser ist es, wenn man den Versuch volle 5 Tage ausdehnen und den Kot, bei regelmäßigem täglichen Stuhlgang, am 4., 5., vielleicht auch noch am 6. Tage entnehmen kann; bei einer Ausdehnung des Versuches auf 4 Tage und normalem Verlauf der Verdauung kann der am 3. und 4. (und vielleicht auch

<sup>1</sup> W. PRAUSNITZ: Zeitschr. Biol. 1894, [N. F.] 12, 335.

noch am 5.<sup>1)</sup> Tage entleerte Kot gesammelt werden. Hierzu kann man sich glasierter Eisentöpfe mit Deckel bedienen, die vor und nach der Entleerung des Kotes gewogen und in denen der Kot direkt entweder im Wasserbade oder auch im Lufttrockenschrank vorgetrocknet und im lufttrockenen Zustande gewogen werden kann. Selbstverständlich muß sowohl während der Kotentleerung als auch der Trocknung der Deckel entfernt werden, aber man wird auf diese Weise — bei guten Abzügen — in keiner Weise von dem Geruch belästigt. Auch erhält man bei einigermaßen regelrechtem Stoffwechsel der Versuchsperson aus den zwei- oder dreitägigen Kotmengen einen genügend zuverlässigen Mittelwert für die täglich entleerte, der täglichen Nahrung entsprechende Kotmenge. Der vorgetrocknete Kot wird in lufttrockenem Zustande gewogen, mit einer Kaffee- oder Gewürzmühle gemahlen und wie üblich untersucht.

**c) Sammlung und Untersuchung des Harnes.** Zur Bestimmung der Verdaulichkeit eines Lebensmittels oder einer Nahrung ist zwar die Sammlung und Untersuchung des während des Versuches abgeschiedenen Harnes nicht erforderlich, doch empfiehlt es sich, den Stoffumsatz im Körper während des Versuches zu verfolgen; dieses geschieht am einfachsten durch eine quantitative Sammlung des Harnes an jedem Versuchstage und durch eine Stickstoffbestimmung in ihm. Durch eine Vergleichung des in der Nahrung aufgenommenen Stickstoffes mit dem im Kot und Harn ausgeschiedenen erfährt man alsdann, ob die Versuchsperson Stickstoff vom Körper abgegeben oder im Körper angesetzt hat<sup>2</sup>. Bei Gleichheit der Mengen des eingenommenen und ausgeschiedenen Stickstoffs spricht man von Stickstoffgleichgewicht.

Der Harn wird vom 2. Versuchstage an bis zum Schlusse gesammelt und untersucht, und zwar am zweckmäßigsten von einem Morgen zum andern, entweder von 7 oder 8 Uhr vor dem ersten Frühstück bzw. nach der um diese Zeit etwa stattfindenden regelmäßigen Kotentleerung. Die Festsetzung der Tagesstunde muß nur gleichmäßig für die Versuchstage geschehen. Wesentlich hierbei ist es, dafür zu sorgen, daß an den Versuchstagen die Menge des entleerten Harnes tunlichst gleichmäßig ist, damit bei zu geringen Harmmengen kein gebundener Stickstoff im Körper zurückgehalten und bei zu großen Mengen aus dem Körper gleichsam ausgeschwemmt wird. Man erreicht das zunächst durch eine gleichmäßige Temperatur in dem Aufenthaltsraume und durch eine gleichmäßige Beschäftigung der Versuchsperson während der Versuchstage, und weiter durch eine gleichmäßige Wasseraufnahme. Letztere läßt sich in der Weise bewirken, daß man die Menge des Tagesharnes am Abend bestimmt und dann noch so viel Wasser genießen läßt, als an der durchschnittlichen Menge für 24 Stunden fehlt. Es wird dann bis zum anderen Morgen (der Wechselstunde) regelmäßig diejenige Menge Harn entleert werden, die an der Durchschnittsmenge noch fehlte. Der während des Tages und der Nacht außer bei der Kotentleerung ausgeschiedene Harn wird am zweckmäßigsten in einer 2—3 l fassenden Flasche mit aufgesetztem Trichter gesammelt und nach jedem Tage entweder genau gemessen oder besser gewogen. Von dem gut durchgemischten Harn dienen alsdann aliquote Teile zur Untersuchung; in der Regel genügt eine Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs, die doppelt in je 100 ccm oder 100 g nach KJELDAHL ausgeführt wird.

**d) Berechnung der Ergebnisse.** Diese wird am einfachsten durch ein Beispiel erläutert. Es rührt von J. KÖNIG<sup>3</sup> her, der den Versuch gelegentlich seiner Untersuchungen über Pentosane ausführen ließ.

Beispiel. Die Versuchsperson (32 Jahre alt, 99 kg schwer) erhielt — neben  $\frac{3}{4}$  l Kaffee mit Milch (Aufguß von 8 g Kaffee), 3 Zwiebäcken (44,7 g) und Leibniz-Kakes (8,7 g) zum ersten Frühstück und 1,55 l Bier (mittags und abends) — gekochte reife Erbsen (ohne Schalen in der Form von Erbsensuppe) und dazu geräucherte Mettwurst. Von der gekochten Erbsen-

<sup>1</sup> Am 6. bzw. 5. Tage nach Beginn des Versuches kann aber nur dann noch der Kot, als zu der vorhergehenden Nahrung gehörig, entnommen werden, wenn er regelmäßig nur einmal im Tage, und zwar morgens vor oder gleich nach dem ersten Frühstück entleert wird.

<sup>2</sup> Die geringen, durch die Haut abgegebenen Mengen gebundenen Stickstoffs können hierbei unberücksichtigt bleiben.

<sup>3</sup> J. KÖNIG u. FR. REINHARDT: Z. 1902, 5, 110 und 1904, 7, 529.



suppe<sup>1</sup> verzehrte die Versuchsperson täglich 1500 g und von der geräucherten Mettwurst 277,0 g. Die hierbei entleerte Kotmenge betrug für den Tag 220,3 g mit 43,35 g Trocken-substanz, die tägliche Harnmenge im Durchschnitt 2410 ccm mit 20,94 g Stickstoff.

Die chemische Zusammensetzung der Nahrungsmittel und des Kotes war folgende:

| Nahrungsmittel<br>bzw. Kot | Wasser | Stickstoff | Protein | Fett  | N-freie<br>Extrakt-<br>stoffe | Pento-<br>sane | Roh-<br>faser | Asche |
|----------------------------|--------|------------|---------|-------|-------------------------------|----------------|---------------|-------|
|                            | %      | %          | %       | %     | %                             | %              | %             | %     |
| Zwieback . . . . .         | 8,55   | 2,43       | 15,19   | 4,28  | 66,06                         | 4,13           | 0,98          | 0,81  |
| Leibniz-Kakes . . . . .    | 5,90   | 1,36       | 8,50    | 8,75  | 72,71                         | 3,13           | 0,27          | 0,74  |
| Erbsensuppe . . . . .      | 78,88  | 0,80       | 5,00    | 1,82  | 11,90                         | 1,07           | 0,62          | 0,71  |
| Geräucherte Mettwurst      | 43,43  | 3,87       | 24,19   | 30,95 | (0,34)                        | —              | —             | 1,09  |
| Kaffee } g in 100 ccm      | —      | 0,0899     | 0,560   | 0,229 | 0,688                         | —              | —             | 0,122 |
| Bier } g in 100 ccm        | —      | 0,092      | 0,560   | —     | 3,984                         | 0,321          | —             | 0,194 |
| Kot . . . . .              | 80,33  | 1,54       | 9,63    | 2,70  | 2,09                          | 0,27           | 2,24          | 2,74  |

Hieraus berechnen sich die wirklich verzehrten und aufgenommenen Mengen Nährstoffe, wie folgt:

| Nahrungsmittel<br>bzw. Getränke             | Täglich<br>ver-<br>zehnte<br>Menge | In der täglich verzehrten Menge |                             |                 |        |                               |                |               |       |
|---|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------|-------------------------------|----------------|---------------|-------|
|   |                                    | Trocken-<br>substanz            | Orga-<br>nische<br>Substanz | Stick-<br>stoff | Fett   | N-freie<br>Extrakt-<br>stoffe | Pento-<br>sane | Roh-<br>faser | Asche |
|   |                                    | g                               | g                           | g               | g      | g                             | g              | g             | g     |
| Erbsensuppe . . . . .                       | 1500,0                             | 316,80                          | 306,15                      | 12,60           | 27,30  | 178,50                        | 16,05          | 9,30          | 10,65 |
| Ger. Mettwurst . . . . .                    | 277,0                              | 156,69                          | 153,67                      | 10,72           | 85,73  | —                             | —              | —             | 3,02  |
| Zwieback . . . . .                          | 44,7                               | 40,87                           | 40,52                       | 1,09            | 1,91   | 29,53                         | 1,85           | 0,49          | 0,36  |
| Leibniz-Kakes . . . . .                     | 8,7                                | 8,18                            | 8,12                        | 0,12            | 0,76   | 6,33                          | 0,27           | 0,02          | 0,06  |
| Kaffee mit Milch . . . . .                  | $\frac{3}{4}$ l                    | 12,02                           | 11,10                       | 0,67            | 1,72   | 5,16                          | —              | —             | 0,92  |
| Bier . . . . .                              | 1,55 l                             | 78,64                           | 75,63                       | 1,43            | —      | 61,75                         | 4,98           | —             | 3,01  |
| Einnahme im ganzen                          | —                                  | 613,20                          | 595,19                      | 26,03           | 117,42 | 281,27                        | 23,15          | 9,91          | 18,02 |
| Ausgeschieden im<br>Kot (220,3 g) . . . . . | —                                  | 43,35                           | 37,30                       | 3,39            | 5,95   | 4,60                          | 0,59           | 4,93          | 6,04  |
| Verdaut . . . . .                           | —                                  | 569,85                          | 557,89                      | 22,64           | 111,47 | 276,67                        | 22,56          | 4,96          | 11,98 |

Oder in Prozenten der verzehrten Bestandteile:

|                                    | % | %     | %     | %     | %     | %     | %     | %     | %     |
|------------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ausgenutzt . . . . .               | — | 92,93 | 93,74 | 86,88 | 94,93 | 98,37 | 97,45 | 50,25 | 66,48 |
| Unausgenutzt (im<br>Kot) . . . . . | — | 7,07  | 6,26  | 13,12 | 5,07  | 1,63  | 2,55  | 49,75 | 33,52 |

#### Stickstoff-Bilanz:

|             | in der Nahrung | im Harn | im Kot | am Körper angesetzt |
|-------------|----------------|---------|--------|---------------------|
| Stickstoff: | 26,03 g        | 20,94 g | 3,39 g | + 1,70 g            |

In einem vorhergehenden Versuch (mit grünen Büchsenerbse) aber unter sonst gleichen Verhältnissen hatte die Versuchsperson 1,26 g Stickstoff vom Körper verloren.

Hier wurde eine gemichte Kost verabreicht, weil es nur darauf ankam, die Ausnutzung der Pentosane zu ermitteln. Soll aber die Ausnutzung (Verdaulichkeit) eines einzelnen Nahrungsmittels für sich allein ermittelt werden, so muß dieses selbstverständlich auch nur für sich allein verabreicht werden; es können dann höchstens einige Zutaten, z. B. für Erbsensuppe Fett und etwas Fleischextrakt sowie als Getränk mäßige Gaben Bier gestattet werden, welche die Verdauung nicht wesentlich beeinflussen.

<sup>1</sup> Die Erbsensuppe wurde in der Weise zubereitet, daß 600 g Erbsen mit 6 g Fleisch-extrakt und rund 300 g geräucherter Mettwurst bis zum völligen Weichwerden gekocht und dann durch ein Sieb gerührt wurden, um die größten Schalen abzutrennen. Von dem Erbsenbrei (bzw. der Suppe) wurden dann entsprechende Anteile zum zweiten Frühstück, mittags und abends verabreicht.

## II. Künstliche Verdauung.

Unter künstlicher Verdauung versteht man die Behandlung der Lebensmittel mit den Verdauungsenzymen außerhalb des Körpers; man beschränkt sich dabei heute meist auf die Bestimmung des verdaulichen Proteins und des Gehaltes an Calorien.

Die künstliche Verdauung ist bereits im Jahre 1880 von A. STUTZER (S. 610) namentlich für die Bestimmung des verdaulichen Proteins in Futtermitteln vorgeschlagen worden und wird auch heute noch zu diesem Zwecke vielfach angewendet, wobei seit 1899 an Stelle des von A. STUTZER empfohlenen, aus Schweinemägen hergestellten, wenig haltbaren künstlichen Magenwandauszuges nach dem Vorschlage von B. SJOLLEMA und K. WEDEMEYER das käufliche Pepsin angewendet wird.

Wie schon oben (S. 1457) erwähnt, tritt H. STEUDEL neuerdings dafür ein, den Verdauungsversuch am Menschen, auf dessen Schwierigkeiten und Mängel bereits oben hingewiesen wurde, durch die künstliche Verdauung zu ersetzen.

### 1. Vorzüge und Mängel der künstlichen Verdauung.

Die Vorzüge der Bestimmung der Verdaulichkeit durch künstliche Verdauung mittels der Verdauungsenzyme gegenüber der durch Verdauungsversuche am Menschen bestehen darin, daß bei ersterer der individuelle Faktor des einzelnen Menschen, der Einfluß der Darmfäulnis und -gärung, ferner auch die Schwierigkeiten der Kotabgrenzung fortfallen und die Bestimmung außerordentlich vereinfacht und abgekürzt wird. Ferner fallen die Störungen der Ergebnisse durch die unkontrollierbaren Beimischungen von Darmsekreten im Kot fort und die Versuche sind jederzeit reproduzierbar.

Die Mängel der künstlichen Verdauung bestehen natürlich darin, daß sie unter anderen Bedingungen stattfindet als beim Versuch am Menschen: Die Verdauungsflüssigkeiten wirken 48 Stunden im Brutschrank bei 37° ein, der Einfluß der Magen- und Darmbewegungen fällt fort; dafür wird das Lebensmittel mit der Verdauungsflüssigkeit geschüttelt. Die allerdings individuelle Bekömmlichkeit und der Einfluß der Zubereitung fallen natürlich beim künstlichen Verdauungsversuch fort.

### 2. Ausführung der Bestimmung.

Nach H. STEUDEL<sup>1</sup> führt man die Bestimmung, wie folgt, aus: Die einzelnen Lebensmittel werden entweder direkt oder nach entsprechender küchenmäßiger Zubereitung ohne weitere Zusätze mit Wasser gar gekocht und hinreichend zerkleinert.

In den so gewonnenen Produkten werden Wasser, Stickstoff, Asche und Wärmewert bestimmt, letzterer im Calorimeter (S. 122). Darauf wird die Verdaulichkeit in folgender Weise festgestellt: 100 g werden mit je 1 Liter der Verdauungsflüssigkeiten 48 Stunden in den Brutschrank von 37° gestellt und während dieser Zeit häufig umgeschüttelt. Man läßt zunächst die Pepsinlösung und dann die Trypsinlösung einwirken, sowie bei stärkereichen Lebensmitteln zwischen beiden einmal oder mehrere Male die Diastaselösung.

Die dabei ungelösten Rückstände werden vor der weiteren Behandlung abgenutscht und mit Alkohol und Äther getrocknet; sie ergeben die Menge des „Unverdauten“ und werden wie oben auf Wasser, Stickstoff, Asche und Wärmewert untersucht. Die Differenz der Ergebnisse der beiden Untersuchungen, in Prozenten der ursprünglichen Substanz berechnet, ergibt den bei der Ernährung verwertbaren Anteil des Lebensmittels.

<sup>1</sup> H. STEUDEL: Zeitschr. ges. exp. Medizin 1935, 95, 580.

**Verdauungsflüssigkeiten.** Alle Lösungen werden mit toluolgesättigtem Wasser hergestellt, und zwar

1. Pepsinlösung. 0,5 g Pepsin DAB VI + 8 ccm konz. Salzsäure werden auf 1 l verdünnt.

2. Trypsinlösung. 0,5 g Pankreatin (Kahlbaum) + 2 g krystall. Natriumcarbonat werden auf 1 l verdünnt<sup>1</sup>.

3. Diastaselösung. 0,05 g Diastase (puriss. Merck) werden in 1 l Wasser gelöst und mit Natriumcarbonatlösung gegen Phenolphthalein ganz schwach alkalisch gemacht.

### 3. Ergebnisse der Bestimmung.

H. STEUDEL fand bei tierischen Lebensmitteln, ferner bei Gemüsen, Kartoffeln, Reis und Weizenmehl gute Übereinstimmung zwischen den durch künstliche Verdauung und den beim Verdauungsversuch am Menschen erhaltenen Werten. Größere Unterschiede ergaben sich bei Brot, Haferflocken und gelben Erbsen; STEUDEL glaubt aber, daß die durch künstliche Verdauung gefundenen Werte die „wirkliche“ Verdaulichkeit anzeigen und daß die durch den Verdauungsversuch am Menschen gefundenen höheren Werte durch die im Darm neben der Verdauung vor sich gehende lebhaftige Bakterientätigkeit zu erklären seien.

## Anhang.

### Stoffumsatz und thermische Energie.

Die im Vorstehenden beschriebene Bestimmung der Verdaulichkeit der Lebensmittel gibt keinen Aufschluß über die Stoffmengen, welche von den verdauten Nährstoffen dem Körper wirklich zugute gekommen sind. Zur Erfassung dieser Mengen dient die Bestimmung des Stoffumsatzes mittels des Respirationsapparates.

Um ferner diejenige Wärmemenge zu bestimmen, welche die Lebensmittel im tierischen Körper erzeugen, dient die Bestimmung der thermischen Energie im Tiercalorimeter.

#### 1. Bestimmung des Stoffumsatzes im Respirationsapparat.

Um Aufschluß über die Stoffmengen zu erhalten, welche von den verdauten Nährstoffen dem Körper wirklich zugute gekommen sind, d. h. in Form von Fleisch oder Fett im Körper angesetzt bzw. zur Erhaltung der tierischen Wärme oder zur Leistung von Arbeit verbraucht sind, bedarf es der Bestimmung des Stoffumsatzes im Respirationsapparat. Bei dieser Bestimmung werden nicht nur die flüssigen und festen Einnahmen und Ausgaben wie oben, sondern auch die nicht sichtbaren Einnahmen und Ausgaben in Einatmungs- und Ausatemungsluft, von der Haut und in Darmgasen ebenfalls festgestellt; das sind Kohlensäure und Wasser in der Einatemungsluft sowie Methan und Wasserstoff in den Darmgasen. Der in der Luft eingeatmete Stickstoff ist am Stoffwechsel nicht beteiligt, und der in der Nahrung aufgenommene gebundene Stickstoff erscheint als solcher, wenn auch in veränderter, gebundener Form, wieder in Harn und Kot; nur ein verschwindend kleiner Teil des in der Nahrung aufgenommenen Stickstoffs verläßt unter regelmäßigen Ernährungsbedingungen als Ammoniak gasförmig den Körper — nur bei größerer Aufnahme von Nitraten in der Nahrung kann freies Stickstoffgas in den Darmgasen auftreten — und die

<sup>1</sup> Wenn das Pankreatin der Trypsinlösung Stickstoffsubstanzen enthält, die in der Verdauungslösung nach 48stündiger Verdauung unlöslich sind, so muß deren Menge beim Verdauungsversuch mit einer Substanz in Abzug gebracht werden.

durch die Haut im Schweiß ausgeschiedene Harnstoffmenge kann als sehr gering ebenfalls vernachlässigt werden. Die in der Einatemluft aufgenommene Menge Sauerstoff läßt sich durch Differenzberechnung feststellen. Denn wenn man das Anfangs- und Endgewicht des Tierkörpers, ferner die Menge der aufgenommenen Nahrung, sowie die ausgeschiedenen sichtbaren Stoffe und die Menge der nicht sichtbaren gasförmigen Stoffe kennt, so ergibt die Differenz zwischen dem Anfangsgewicht + Nahrung und sämtlichen Ausgaben + Endgewicht des Körpers die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs. Das nachfolgende Beispiel möge diese Verhältnisse erläutern.

## Stoffwechsel-Gleichung bei einem Hunde.

| Einnahmen:                               | Ausgaben:                               |
|--|---|
| Anfangsgewicht des Hundes . . . 33590 g  | Endgewicht des Hundes . . . . . 33557 g |
| Futter (Fleisch) . . . . . 1500 „        | Kot . . . . . 52 „                      |
| Im ganzen 35090 g                        | Harn . . . . . 1099 „                   |
|  | Kohlensäure . . . . . 545,5 „           |
|  | Wasserdampf . . . . . 369,5 „           |
|  | Methan . . . . . 0,8 „                  |
|  | Wasserstoff . . . . . 3,4 „             |
|  | Im ganzen 35627,2 g                     |
| Gesamt-Ausgaben . . . . . 35627,2 g      |   |
| Gesamt-Einnahmen . . . . . 35090,0 „     |   |
| Überschuß = Sauerstoff . . . . . 537,2 g |   |

In dieser Stoffwechsel-Gleichung bietet die Ermittlung der sichtbaren Einnahmen und Ausgaben keine Schwierigkeit; umfangreichere Einrichtungen und mehr Arbeit erfordert aber die Ermittlung der nicht sichtbaren Ausgaben. Hierfür die Grundlagen geschaffen zu haben, ist das Verdienst M. v. PETTENKOFERS<sup>1</sup>, der dafür seinen Respirationsapparat konstruierte (s. Bd. I, S. 1207). M. RUBNER hat diesen Apparat insbesondere für Versuche beim Menschen eingerichtet. Von einer Beschreibung des Respirationsapparates und Angaben über die Ausführung der Versuche damit sei hier abgesehen, da nur wenige Fachgenossen Gelegenheit haben werden, mit einem solchen Apparat zu arbeiten. Diejenigen, welche Respirationsversuche anzustellen beabsichtigen, seien auf die Veröffentlichungen von M. v. PETTENKOFER und C. VOIT<sup>2</sup>, W. HENNEBERG<sup>3</sup> sowie O. KELLNER<sup>4</sup> verwiesen.

## 2. Bestimmung der thermischen Energie.

Die in den Nährstoffen der Nahrung in ruhender (latenter) Form aufgespeicherte, direkt oder indirekt durch Sonnenwärme und -licht gebildete potentielle Energie wird durch ihre Zersetzung und Oxydation im Tierkörper in erkennbare aktive Form, in kinetische Energie umgewandelt, die einerseits als freie Wärme, als thermische Energie, auftritt, andererseits zu den Lebensfunktionen der Zellen als dynamische Energie dient, welche letztere aber auch bei dem Vollzuge ihrer Leistungen in den Zellen ohne Verlust den Endzustand der Wärme annimmt. Die Verwertung der in den Nährstoffen aufgenommenen Energie zu thermischer Energie hängt namentlich von

<sup>1</sup> M. v. PETTENKOFER: Journ. prakt. Chem. 82, 40.

<sup>2</sup> M. v. PETTENKOFER u. C. VOIT: Ann. Chem. Pharm. 1862, II. Suppl.-Bd., S. 1; Zeitschr. Biol. 1866, 2, 472.

<sup>3</sup> W. HENNEBERG: Neue Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer, S. 5. Göttingen 1870.

<sup>4</sup> O. KELLNER: Arbeiten der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Möckern 1894; Landw. Vers.-Stationen 1894, 44, 264.

der Umgebungstemperatur ab, während die dynamische Energie unabhängig hiervon in Funktion tritt. Bei 30—33° liegt der kritische Punkt, bei dem der Körper keine Wärme mehr zur Deckung des Wärmeverlustes zu erzeugen hat; von diesem Punkte an beschränkt sich der Stoffzerfall lediglich noch auf die Deckung des Bedarfes an dynamischer Energie; die direkt erzeugte Wärme ist physiologisch bedeutungslos (s. Bd. I, S. 1223).

Um auch die Grundlagen für diese Verhältnisse zu gewinnen, ist in erster Linie die Beantwortung der Frage notwendig, wie sich die einzelnen Nährstoffe bezüglich des Wärme- (Calorien-) Wertes im lebenden Körper verhalten, ob sie hier denselben oder einen anderen Wärmewert äußern wie außerhalb des Körpers. Zur Prüfung dieser Frage hat M. RUBNER<sup>1</sup> sich des Tiercalorimeters bedient. Von einer Beschreibung dieses Calorimeters und seiner Verwendung kann aus den schon beim Respirationsapparat angegebenen Gründen abgesehen werden.

Nach diesem Verfahren hat M. RUBNER gefunden, daß die Nährstoffe im Tierkörper dieselbe Verbrennungswärme (isodynamen Wert) äußern wie im Calorimeter. Man kann also den physiologischen Nutzwert der Nährstoffe der Nahrung nach ihrem calorischen Werte berechnen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß von dem zugeführten calorischen Werte bei den einzelnen Nährstoffen ein verschiedener Anteil in nutzbarer Form dem Körper zugute kommt.

Von dem Gesamt-Wärmewert des aschen- und fettfreien Muskelfleisches (Proteinstoffe) = 534,5 Calorien werden z. B. nach Abzug der in Kot und Harn abgeschiedenen Calorien dem Körper nur 400,0 Calorien oder 73,3% zugeführt, während die 940 Calorien von Fett und die 395,5 Calorien von Saccharose für je 100 g Substanz keine wesentlichen Verluste im Kot oder Harn erleiden, sondern dem Körper als vollwertig zugeführt werden. In welchem Verhältnis nun diese Nährstoffe sich an der Lieferung von thermischer und dynamischer Energie beteiligen, kann aus einem Versuche M. RUBNERS an einem Hunde berechnet werden. Der hungernde Hund gab z. B. bei 30° in 24 Stunden für 1 kg Körpergewicht 55,4 Calorien an Wärme ab; als dann dem Hunde in Form von Fleisch, Fett und Saccharose annähernd so viel Calorien gereicht wurden, wie dem Wärmeverluste bei 30° entsprachen, trat eine Wärmevermehrung gegenüber dem Hungerzustand ein, und zwar betrug bei der Fütterung mit

|   | Fleisch | Fett  | Saccharose |
|---|---------|-------|------------|
| die Wärmevermehrung . . . . .                   | 30,9    | 12,7  | 5,8%       |
| 100 g Nähr- { dynamische Energie . . . . .      | 276,0   | 821,6 | 372,6 Cal. |
| stoffe lieferten { thermische Energie . . . . . | 124,0   | 118,4 | 22,9 „     |
| im ganzen . . . . .                             | 400,0   | 940,0 | 395,5 „    |

<sup>1</sup> M. RUBNER: Beiträge zur Physiologie. Festschrift der medicin. Fakultät zu Marburg zum 50 jährigen Doktor-Jubiläum von C. LUDWIG 1891; vgl. auch ED. CRAMER: Arch. Hygiene 1890, 10, 283.

# Vitamine.

Von

Professor **DR. A. SCHEUNERT** und Privatdozent **DR. M. SCHIEBLICH**-Leipzig.

Mit 47 Abbildungen.

Noch heute ist es bei keinem einzigen Vitamin gelungen, eine einwandfrei arbeitende Methode zu schaffen, die es gestattet, auf Grund chemischer oder physikalischer Reaktionen mit kurzer Laboratoriumsarbeit den Nachweis des Vorkommens zu führen oder gar quantitativ die Wirksamkeit zu ermitteln. Allerdings sind hoffnungsvolle Ansätze zum Ausbau solcher Methoden vorhanden, z. B. die Farbreaktionen und spektroskopischen Eigenschaften der fettlöslichen Vitamine und die TILLMANSSche Titrationsmethode, die sich auf die reduzierenden Eigenschaften des Vitamins C gegen sehr reduktionsempfindliche Farbstoffe gründet. Noch immer aber ist die Spezifität solcher Methoden nicht befriedigend sichergestellt, und es bestehen große Schwierigkeiten, die Vitamine aus den Gemischen der mit ihnen gleichzeitig vorkommenden anderen Naturstoffe leicht und so vollkommen zu isolieren, daß die gewonnenen Lösungen den Ansprüchen der chemischen Untersuchungsmethode zur Erlangung einwandfreier Ergebnisse entsprechen. Somit bleibt nur der Weg des biologischen Versuches, der es mit für die betreffenden Vitamine geeigneten Versuchstieren gestattet, die Mangelerscheinungen beim Fehlen des nachzuweisenden Vitamins zum Ausdruck zu bringen und durch Darstellung der charakteristischen biologischen Wirkungen den Nachweis des Vorhandenseins des betreffenden Vitamins zu führen. Die Vitaminmethodik ist also genötigt gewesen, den Tierversuch so exakt zu gestalten, daß die klinische Inspektion der Versuchstiere das Fehlen oder die Anwesenheit des nachzuweisenden Vitamins einwandfrei ergibt. Dies ist aber nur möglich bei entsprechender biologischer Eignung der Versuchstiere, ihrer sachgemäßen Pflege, Haltung und Wartung, der richtigen Fütterung und dem sorgfältigen Ausbau der Auswertung der klinischen Symptome.

## I. Versuchstiere.

Mit Ausnahme des Vitamins C steht für alle Vitaminarbeiten die Ratte als Versuchstier an erster Stelle. Durch ihre große Fortpflanzungsfähigkeit, ihre Wüchsigkeit und ihre Handlichkeit ist dieses Tier ganz hervorragend für alle derartigen Versuchszwecke und damit überhaupt für das Studium und die Erforschung von Ernährungsfragen geeignet. Neben dieses Versuchstier treten, als für Vitaminarbeiten geeignet, noch die anderen bekannten Laboratoriumstiere. Man wird sich ihrer aber im allgemeinen nur für spezielle Zwecke bedienen. Unter ihnen ragen nur einige wenige heraus, die im Laufe der Entwicklung der Vitaminforschung für dieses oder jenes Vitamin besondere Bedeutung gewonnen haben. Für Vitamin A sind dies Kücken, für Vitamin B<sub>1</sub> unter unseren europäischen Verhältnissen die Taube und vielleicht noch das Huhn, für Vitamin B<sub>3</sub> ebenfalls die Taube. Für die speziellen Zwecke der Toxizitätsbestimmung von Vitamin-D-Konzentraten hat sich die Maus als Versuchstier besser als die Ratte bewährt. Für das Vitamin C endlich, für dessen

Mangel Ratten nicht empfindlich sind, ist das Meerschweinchen allgemeines Versuchstier geworden.

Im folgenden sollen Zucht, Haltung und Ernährung der einzelnen Versuchstierarten kurz geschildert werden.

## 1. Ratte.

### a) Rasse.

Zu allen ernährungsphysiologischen Untersuchungen werden gezüchtete Ratten verwendet, und zwar werden dazu die domestizierten Formen der grauen oder braunen Wanderratte, *Mus norvegicus* ERXLEBEN s. *Mus decumanus* PALLAS benutzt. Diese, aus Liebhaberei und als Laboratoriumstiere schon seit langer Zeit gezüchtet, sind in einer schwarzweißen Varietät mit dunklen Augen und auch in der albinotischen Form, ganz weiß mit roten Augen, als die in Frage kommenden Versuchstiere eingebürgert.

Die Wildform, also die eigentliche graue Ratte, die sich überall findet, und die alte, nur noch selten anzutreffende Hausratte, *Mus rattus*, kommen für Vitaminversuche nicht in Frage, die letztgenannte schon wegen ihrer Seltenheit, die wilde Wanderratte, *Mus decumanus*, vor allem wegen ihrer verhältnismäßig schweren Zucht und ihrer großen Wildheit. Diese Tiere pflanzen sich in der Gefangenschaft sehr unregelmäßig fort; die Zahl der Würfe ist schwankend und unsicher und die Entwicklung der einzelnen Tiere und ihr Wachstum sind sehr verschieden. Vor allem aber macht die große Wildheit und Angriffslust, die den in hartem Kampfe ums Dasein stehenden Tieren innewohnt, das Arbeiten mit ihnen ungemein schwierig. Unter Laboratoriumsverhältnissen gehalten, sind sie ängstlich und scheu, infolgedessen bissig und stets darauf bedacht, zu entfliehen, so daß ein experimentelles Hantieren mit ihnen mit großen Unzuträglichkeiten verbunden ist.

Alle diese unbequemen Eigenschaften besitzen die genannten domestizierten Formen nicht, insbesondere sind sie bei guter Ernährung und freundlicher Behandlung sehr zutraulich, lernen ihren Pfleger kennen und können ohne Schutzmaßnahmen mit bloßer Hand angegriffen und untersucht werden. Auch die Gefahr eines Entlaufens ist bei ihnen so gut wie ausgeschlossen, da bei ihnen Fluchtabsichten nicht mehr bestehen.

Will man Vitaminuntersuchungen mit Ratten anstellen, so wird man im allgemeinen nur dann Erfolg haben, wenn die jungen Tiere aus einer für Ernährungszwecke sachgemäß geleiteten Rattenkolonie stammen.

Im freien Handel gekaufte junge Tiere sind oft lebensschwach, wachsen schlecht und gehen an Krankheiten, deren Keim sie schon aus dem Zuchtstall mitbringen, zugrunde. Man kann bei solchem Vorgehen sehr große Enttäuschungen und Geldverluste erleiden. Da zu den Vitaminversuchen immer große Tierreihen angesetzt werden müssen, ist der Geldaufwand, wenn auch die Kosten für die einzelnen Tiere gering sind, oft recht erheblich. Verluste von 50% und mehr sind bei gekauften jungen Tieren häufig. Abgesehen von der Geldeinbuße wird aber bei Absterben eines größeren Prozentsatzes der angesetzten Tiere das Versuchsergebnis unsicher, ja, meist wird es überhaupt in Frage gestellt. Es geht daraus hervor, daß es zweckmäßig ist, die Ratten selbst zu züchten. Kauft man erwachsene Tiere im freien Handel, so wird man im allgemeinen immer nur verhältnismäßig leichte und schwache Tiere erhalten, und man kann auch von diesen eine wüchsige Nachkommenschaft nicht sofort erwarten. Naturgemäß wird der zu Handelszwecken züchtende Tierhändler keinen besonderen Wert darauf legen, große, starke und wüchsige Tiere zu erzielen, da solche Tiere nur bei hohem Kostenaufwand, sorgfältiger Pflege und guter Fütterung erzielt werden können und es für ihn in erster Linie darauf ankommt, zahlreiche und große Würfe zu erhalten, also einen raschen Umsatz zu erreichen. Auch wird man leicht alte, nicht mehr gut fortpflanzungsfähige Tiere erhalten. So kommt es, daß man als erwachsene Tiere im Handel Weibchen nicht höher als mit 150 g und Männchen nur bis zu 250 g Gewicht erhält. Züchtet man aber bei sorgfältiger Haltung solches Tiermaterial in Inzucht über einige Generationen fort, so kommt man sehr bald zu viel besser ausgebildeten Tieren, und wenn man auch nur schwierig Rekordgewichte, wie sie mit 600 g für ein Rattenmännchen in der amerikanischen Literatur (OSBORNE und MENDEL) angegeben werden, erzielen wird, so erhält man doch leicht ausgewachsene Männchen im Gewicht bis 400 g und Weibchen bis 250 g. Kräftige Elterntiere müssen aber vorhanden sein, wenn man eine wüchsige

und widerstandsfähige Nachkommenschaft erzielen will. Mit solcher steht und fällt die Sicherheit der Ergebnisse jeglicher Vitaminforschung. Wird die junge wachsende Ratte mit 40—50 g, also durchschnittlich 45 g bei einem Alter von 3—4 Wochen in den Versuch genommen, so muß eine männliche Ratte bei vollwertiger, also keine Mängel aufweisender Ernährung innerhalb 10—15 Tagen ihr Gewicht verdoppeln, innerhalb 40—50 Tagen vervierfachen. Bei weiblichen Ratten ist das Wachstum nicht ganz so rasch, doch muß auch hier die erste Gewichtsverdopplung bei gleichem Anfangsgewicht und Anfangsalter in mindestens 20 Tagen erreicht sein. (DONALDSEN<sup>1</sup>). Diese Zahlen sind natürlich Durchschnittszahlen. Bei guten Versuchstieren muß man sie aber als Maßstab zugrunde legen. In der Originalliteratur und in solchen Arbeiten, die sich speziell mit der Wüchsigkeit der zahmen Ratte befassen, wird man noch steilere Gewichtsanstiege feststellen können. In Abb. 1 geben wir Wachstumskurven unserer Zuchtratten aus den Jahren 1926/27 wieder.

### b) Anlage der Zucht.

Durch die Erfahrungen vieler Laboratorien hat es sich als zweckmäßig erwiesen, zur Erzielung ständig gleichbleibenden Jungtiermaterials Inzucht zu treiben. Man kann dazu von einem oder mehreren Stammwürfen ausgehen und baut dann daraus die Zucht soweit aus, wie es die laufend benötigte Anzahl von Versuchstieren erfordert. Inzuchtschädigungen treten bei optimaler Ernährung der Zuchttiere nicht auf, besonders dann nicht, wenn man darauf bedacht ist, die Elterntiere nicht zu jung zu paaren und die Muttertiere nicht zu sehr zu überanstrengen. Optimale Ernährung, über die auf S. 1477—1480 Näheres nachzulesen ist, ist aber sowieso unerlässlich, wenn man reichhaltige Würfe von großer Wüchsigkeit erzielen will. Naturgemäß wird man auch darauf bedacht sein, schwächliche und kränkliche oder sonstwie körperlich unbefriedigende Tiere auszuschalten. Die Hereinnahme frischen Blutes ist nach unseren eigenen und zahlreichen anderen Erfahrungen dann auch bei jahrelanger Inzucht nicht notwendig.

Wir haben die Erfahrung gemacht, daß Aufstellung neuer, aus anderen Instituten oder aus dem Handel zugekaufter Elterntiere regelmäßig zu Rückschlägen in der Zucht führte. Muß also die Zucht vergrößert werden, so empfiehlt sich ein allmählicher Ausbau unter Verwendung des eigenen Tiermaterials. Wir haben mehrfach bei durch äußere Verhältnisse plötzlich gebotene Vermehrung durch Hereinnahme fremder ausgewachsener Tiere starke Rückgänge in der Produktion von Jungen, manchmal unter das frühere Ausmaß gehabt, trotzdem eine größere Anzahl neuer Elterntiere in die Zucht eingefügt wurden, als vorher vorhanden waren. Die zugekauften Tiere müssen sich stets erst an die neuen Haltungs- und Ernährungsverhältnisse gewöhnen, und oft vergehen Monate, bis die neuen Weibchen die volle Produktionsfähigkeit erlangen. Weiter besteht die Gefahr, daß Krank-

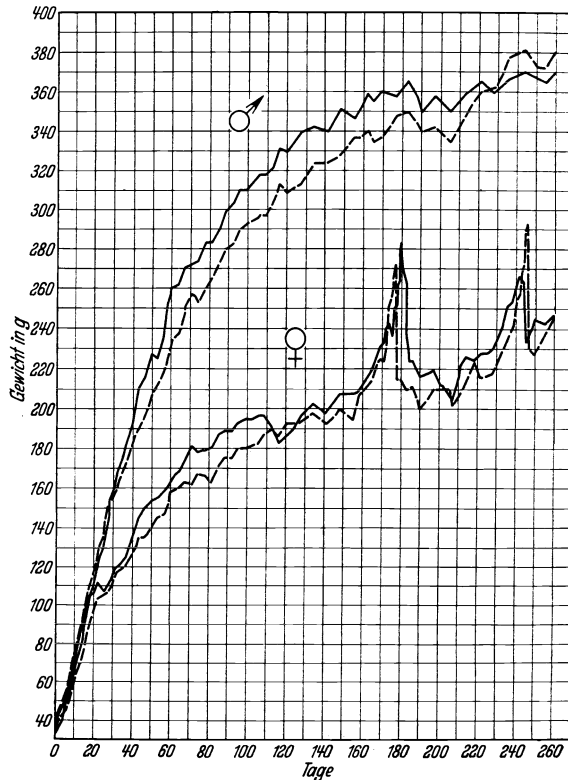


Abb. 1. Normale Wachstumskurven unserer Zuchtratten.

<sup>1</sup> H. H. DONALDSEN: The rat. Data and reference tables. 2. Aufl. Philadelphia 1924.



heiten, wie Schnupfen, infektiöse Pneumonien, infektiöse Magendarmerkrankungen und vor allem Räude, eingeschleppt werden und hierdurch schwere Rückschläge erfolgen.

Nach unseren Erfahrungen hat sich am besten das Vorgehen bewährt, das in Kleintierzüchterkreisen unter dem Namen „wilde“ Zucht bekannt ist. Es werden dazu in größeren Käfigen etwa 10–15 Weibchen mit etwa der Hälfte Männchen zusammengehalten. Es empfiehlt sich, nicht zu viel Männchen zu nehmen, da bei zu häufiger Begattung eines Weibchens die Resorption des Spermas zu Sterilität führen könnte. Bei Meerschweinchen zeigte dies BEUCHELT<sup>1</sup>. Die Tiere leben unter den geschilderten Verhältnissen durchaus friedlich zusammen, und es finden keinerlei Kämpfe der Männchen statt. Man hat auf diese Weise die Sicherheit, daß ein Weibchen, sobald es brünstig wird, auch belegt wird, da man von vornherein nicht wissen kann, ob bei einem Einzelpärchen die Brünstigkeit des Weibchens sogleich Begattung und Befruchtung herbeiführt. Es empfiehlt sich dann, aus einem solchen von mehreren Tieren beiderlei Geschlechts besetzten Zuchtstall einmal oder zweimal wöchentlich die Weibchen herauszunehmen und zu kontrollieren. Stellt man bei ihnen durch Befühlen und Betrachtung Dickwerden des Leibes und Ausbildung der Zitzen fest, so kann man dieses Tier als tragend betrachten. Es wird nunmehr in einen Einzelkäfig überführt. Hierbei wird, was schon an dieser Stelle hervorgehoben sei, das Tier genau betrachtet, ob sich Anzeichen von Räude bei ihm zeigen. In diesem Falle werden die erkrankten Stellen mit Perubalsam eingerieben. Dies ist zur Räudebekämpfung in der Rattenzucht unbedingt notwendig. Bei einiger Übung gelingt es leicht, die Trächtigkeit festzustellen, und ebenso macht es bald keine Schwierigkeiten mehr, die einzelnen Tiere auseinander zu kennen. Wenn man dann bemerkt, daß das eine oder andere der Weibchen längere Zeit nicht tragend geworden ist, so ist es auszuschalten.

Von manchen Laboratorien, z. B. GREENMAN und DUHRING<sup>2</sup>, ist empfohlen worden stets ein Männchen und ein Weibchen in Einzelkäfigen zu halten und auf diese Weise zu züchten. Wir haben diese Methode ebenfalls über längere Zeit geprüft, sind aber von ihr wieder abgekommen. Es stellte sich heraus, daß zwischen zwei Würfen oft sehr große Zwischenräume lagen, ja, manchmal Monate vergingen, bis das Weibchen wieder tragend wurde, während es, mit anderen Männchen zusammengebracht, sofort wieder erfolgreich gedeckt wurde. Zu besseren Erfolgen kamen wir bei Zuchtversuchen mit Zusammensetzen von 1 Männchen mit 2 Weibchen, wobei aber auch keineswegs sofortiges Zukommen der beiden Weibchen gesichert ist.

Zur Durchführung dieser Zuchtmaßnahmen ist es notwendig, einen interessierten und den Tieren gegenüber liebevoll eingestellten Pfleger zu verwenden. Zweifellos eignen sich dazu am besten wissenschaftlich gebildete Kräfte, die züchterisches Verständnis besitzen, also Akademiker oder sehr erfahrene Laboranten oder Laborantinnen. Am besten ist es, wenn Zuchtbücher geführt und alle Daten genau registriert werden. Um so leichter werden sich ungeeignete Zuchttiere ausschalten lassen, und es wird möglich sein, zur Zucht immer wieder nur diejenigen Tiere zu verwenden, die die beste Nachkommenschaft erzielen. Ein solches Vorgehen zum Ausbau einer vorbildlichen, gut geleiteten Zucht ist im Grunde genommen eine Personal-, Raum- und damit natürlich Kostenfrage.

### c) Zucht und Haltung.

**α) Käfige.** Zur Zucht der zahmen Ratte eignet sich jedweder Käfig, sofern er geräumig genug ist. Nach unseren Erfahrungen haben sich am besten Käfige bewährt, die aus Stampfbeton in Zellenform an den Wänden des Zuchtraumes rasch und ohne allzu erhebliche Kosten angebracht werden können. Die Art

<sup>1</sup> H. BEUCHELT: Arch. wiss. u. prakt. Tierheilk. 1932, **64**, 345.

<sup>2</sup> M. J. GREENMAN and F. A. DUHRING: Breeding and care of the albino rat for research purposes. Philadelphia 1923.

der Anlage und die Größenverhältnisse gehen aus Abb. 2 hervor. Die Käfige sind gekalkt und werden von Zeit zu Zeit ausgescheuert und durch erneute Kalkung desinfiziert. Bei den Einzelkäfigen, die zum Werfen bestimmt sind, erfolgt diese Kalkung bei jeder Neubesetzung mit einem tragenden Tier. Die Böden der Käfige sind horizontal und verlaufen vor der Türöffnung einige Zentimeter schräg nach oben. Dadurch wird Herausfallen der Bettung vermieden und sie können leicht mit Schaufel und Handbesen gesäubert werden.

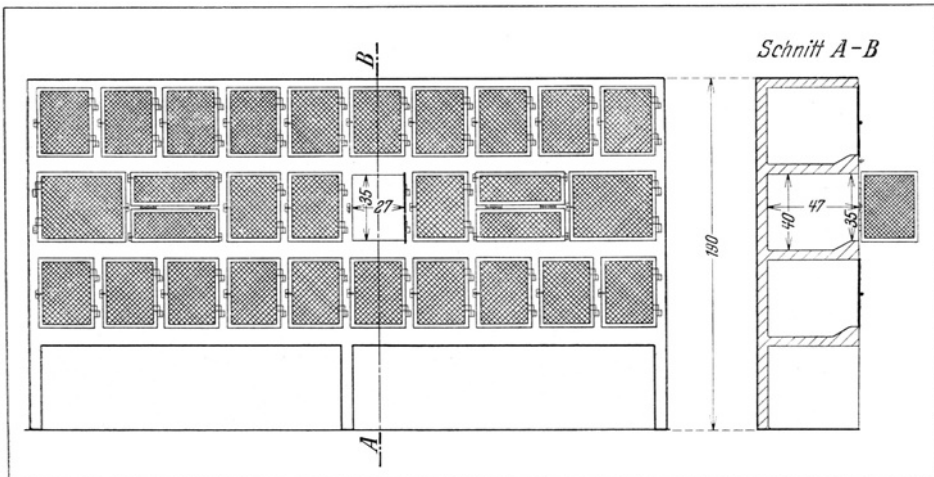


Abb. 2. Rattenzuchtkäfige aus Stampfbeton (Maße in Zentimetern).

Als Verschuß haben sich einfache Drahttüren in Eisenrahmen bewährt, die sich in Scharnieren drehbar, zweckmäßigerweise alle nach der gleichen Seite öffnen lassen. Das Drahtgeflecht muß aus starkem Draht und die Maschengröße so gering sein, daß die kleinen Ratten nicht hindurchklettern können. Die Bettung besteht aus gewöhnlichen, ungesiebten Sägespänen, von denen man so viel hineingibt, daß der Boden leicht bedeckt ist. In die Einzelkäfige, in denen die Ratten werfen sollen, gibt man einige Hände voll Sägespäne mehr, damit sich die Ratten ein Nest bauen können. Die Sägespäne dienen dazu, den Tieren eine warme und scharrfähige Unterlage zu bieten und gleichzeitig die Exkreme aufzusaugen. Damit werden Abflußeinrichtungen für Harn u. dgl. überflüssig. Selbstverständlich muß eine entsprechend häufige Reinigung erfolgen. In den Paarungskäfigen wird die alte Unterlage zwei- bis dreimal in der Woche durch neue Sägespäne ersetzt. In den Wurfkäfigen wird ebenfalls zweimal in der Woche neue Bettung gegeben und nur nach dem Tag des Werfens wird der Wurf 2 Tage bei der gerade vorhandenen Bettung belassen. Dann wird bei jeder Reinigung der Wurf herausgenommen und nach Einbringen neuer Sägespäne in den Käfig zurückgebracht.

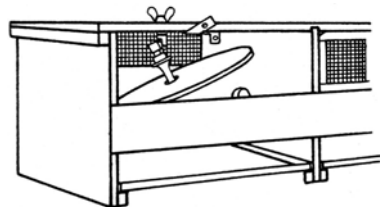


Abb. 3. Rattenzuchtkäfig aus Holz nach GREENMAN und DUHRING.

Es eignen sich, wie schon erwähnt, auch gewöhnliche Drahtkäfige oder irgendwelche andere Behältnisse. Bedingung ist auch hier größte Sauberkeit.

In englischer und amerikanischer Zucht hat man eine Zeitlang großen Wert darauf gelegt, daß die Ratten und insbesondere die Nachkommenschaft sich ausreichend bewegen

und somit auch ihre Körperkräfte üben können. Es wurde angegeben, daß hierdurch besonders die Wüchsigkeit und Widerstandsfähigkeit, also die Vitalität der Würfe begünstigt wird. GREENMAN und DUHRING<sup>1</sup> geben zweiteilige Holzkäfige an, in deren einem Teil sich ein wie die Drehplatte eines Grammophons konstruiertes Karussell befindet (Abb. 3). Auch kann man mit Hilfe eines Fahrradrades leicht eine drehbare Drahttrommel an den Käfigen anbringen, die, durch eine Öffnung vom Inneren zugänglich, von den Tieren als Lauf- rad benutzt werden kann (Abb. 4 und 5). Wir haben auch solche Zuchtkäfige durchprobiert,

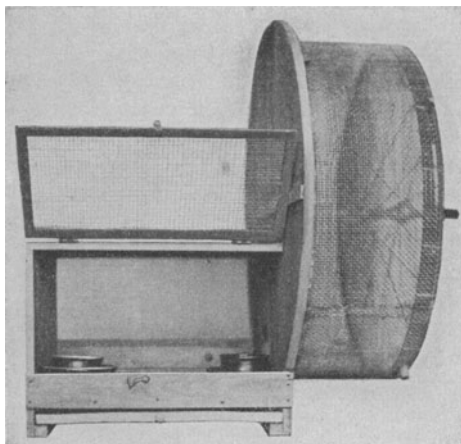


Abb. 4. Rattenzuchtkäfig mit Lauftrommel.

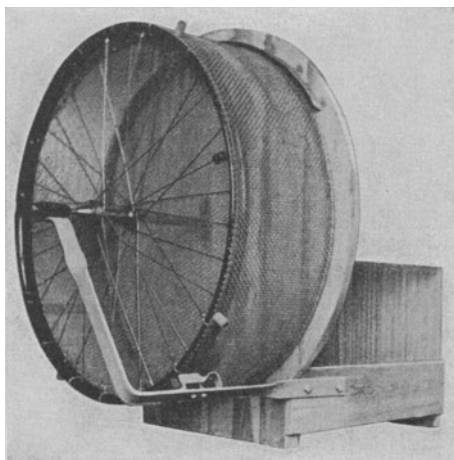


Abb. 5. Rattenzuchtkäfig mit Lauftrommel.

ohne darin besondere Vorteile zu sehen. Vor allem erwies sich ihre Konstruktion aus Holz, wie Holzkäfige überhaupt in jeder Kleintierzucht zu wissenschaftlichen Zwecken, als nicht empfehlenswert. Wenn- gleich daran Drahtböden, auf denen die Tiere sitzen und herausziehbare Blech- kästen zum Auffangen der Exkreme- te angebracht sind, so ist es doch unmöglich, die Holzteile ganz trocken zu erhalten. Die feuchte Nahrung, das Trinkwasser und die Exkreme- te gelangen doch im Laufe der Zeit mit den Holzteilen in Berührung und führen dann Fäulnis und Verrottung herbei, so daß die Käfige nach 1—2 Jahren so morsch sind, daß sie erneuert werden müssen, was stets mit erheblichen Kosten wegen der damit ver- bundenen Maßtschlerarbeit verknüpft ist. Auch gewinnen die Holzkäfige bald ein unsauberes Aussehen und verbreiten üblen Geruch. Abgesehen davon ist aber nach unserer Ansicht das Halten von Zucht- tieren und Würfen auf Drahtnetzen nicht empfehlenswert, zum mindesten kann es für die Tiere sehr unbequem sein, ferner fallen stets Teile der Bettung und Nah- rungsreste durch die Drahtgitter hindurch und erhöhen die Verschmutzungsmög- lichen. Wir sind infolgedessen immer wieder zu den geschilderten Betonkäfigen zurückgekehrt. Bei Sauberhaltung ist der Geruch einer solchen Rattenkolonie trotz starker Besetzung mit Hunderten von Ratten gering, die Tiere sitzen warm, haben in der Tiefe des Käfigs bei der dort herrschenden Dämmerung erwünschte Zu- fluchtmöglichkeiten und können trotz- dem auf den ersten Blick durch die Drahttür gesehen werden.

β) Zuchtraum. Der Zuchtraum muß gut ventiliert sein. Wenn sich starke Ammoniakentwicklung durch Harnzersetzung nicht vermeiden läßt, so kann durch Aufstellung einer Schale mit dem Säuregemisch nach

Prof. v. KAPFF in kurzer Zeit eine vollständige Reinigung der Atmosphäre erzielt werden. Ferner muß der Zuchtraum heizbar sein. Am besten wäre eine Dauer- heizung mit Temperaturregulierung, die immer das Einhalten von 22° als der für die Ratten am zuträglichsten Temperatur gestattet. Es ist dafür zu sorgen, daß der Zuchtraum nicht gleichzeitig zu anderen Manipulationen, Futterkochen usw. verwendet wird, um die Tiere nicht zu beunruhigen. Ebenso sollen die Räume nicht unnötig betreten werden, und es ist durch geeigneten Verschluss von

<sup>1</sup> M. J. GREENMAN and F. A. DUHRING: Breeding and care of the albino rat for research purposes. Philadelphia 1923.

Fenstern, Türen und sonstigen Öffnungen dafür zu sorgen, daß nicht andere Tiere, Katzen, Hunde, vor allem aber wilde Ratten und Mäuse zu ihnen Zutritt haben. Auch der sich häufig einstellenden Fliegenplage ist mit allen Mitteln entgegenzuarbeiten. Durch Insekten, und besonders wilde Ratten und Mäuse können Krankheiten übertragen oder sonstige naheliegende Störungen, Begattungen, Wegfressen des Futters usw. bei schlechter Anlage der Käfige verursacht werden.

γ) **Zucht und Behandlung.** Die zahme Ratte hat eine Tragdauer von 21 bis 22 Tagen und bringt dann Würfe von 6—12 Stück zur Welt. Stärkere Würfe kommen bei kräftigen Tieren und guter Ernährung ebenfalls nicht allzu selten vor. Wir beobachteten Würfe bis zu 16 Stück. Es empfiehlt sich in solchen Fällen, die Würfe auf 10—12 Stück zu reduzieren. Die entfernten Jungtiere können, falls Gelegenheit dazu vorhanden ist, einer anderen säugenden Mutter, die einen schwächeren Wurf hat, untergelegt werden. Sie werden meist ohne weiteres angenommen. Würfe unter 6 Stück werden auch beobachtet, sind aber als unbefriedigend zu bezeichnen. Es empfiehlt sich deshalb, eine Mutter, die mehrmals solche kleine Würfe gebracht hat, aus der Zucht auszuschalten. Manche Laboratorien reduzieren grundsätzlich alle Würfe auf 6 oder 8 Stück, um dadurch eine bessere Aufzucht zu sichern. Je nach der Art der vorzunehmenden Untersuchungen und dem Bedarf an jungen Ratten muß man sich diesem Vorgehen anschließen oder, wie wir es tun, auch größere Würfe bei der Mutter belassen. Die weiblichen Ratten kommen oft schon in recht jugendlichem Alter zu. Ein zu früher Beginn der Zucht ist aber nicht zu empfehlen, da solche Nachkommenschaft nicht befriedigt, entweder von der Mutter selbst zerstört oder nur schwer aufgezogen wird. Die weiblichen Tiere sollten deshalb ein Alter von 120 Tagen besitzen, ehe sie mit den Männchen zusammengebracht werden, schwächere Tiere wird man auch dann noch nicht zur Zucht verwenden. Nach unseren Erfahrungen hat es sich bewährt, auch nicht allzu alte Tiere zu benutzen und den Ratten nicht zu häufige Würfe zuzumuten. Im allgemeinen zieht eine Mutterratte ihren Wurf in 3—4 Wochen so weit auf, daß die jungen Ratten selbständig fressen und ein Gewicht von 40—45 g erreichen. Die jungen Ratten werden dann abgesetzt und kommen in den Versuch. Der Mutterratte wird bei uns hiernach eine Ruhepause von 14 Tagen gegönnt, während der sie reichlich gefüttert wird und ihre Reserven ergänzen kann. Junge Mutterratten wachsen nach dem ersten Wurf noch erheblich und bedürfen dazu auch noch ausreichender Nährstoffe. Nach diesen 14 Tagen kommt die Ratte wieder in den Paarungskäfig. Im allgemeinen folgt der nächste Wurf wieder nach 4 bis 5 Wochen und so fort. Wir beobachteten regelmäßig, daß in den Wintermonaten November bis Februar die Fruchtbarkeit nachläßt und die Tiere nur mit größeren Zwischenräumen tragend werden. Man kommt so im Jahr auf 3—4 Würfe und könnte die Wurfzahl günstigstenfalls auf 5 steigern, doch erscheint uns diese Wurfzahl im Interesse der Tiere nicht als erwünscht. Im allgemeinen verwenden wir die Mutterratten im Höchstfall bis zum Alter von 1½ Jahren zur Zucht, wobei 5—6 Würfe erhalten werden. Mit stärkerer Ausnutzung haben wir, wie schon gesagt, keine befriedigenden Erfolge gehabt. Die Böcke kommen ebenfalls im Alter von 120 Tagen zum Decken und werden ebenfalls höchstens 1½ Jahre lang zur Zucht verwendet. Ihr Ersatz ist, da in der Zucht stets reichliches männliches Material vorhanden ist, leicht möglich, und es empfiehlt sich, lieber jüngere als überalterte Tiere zu benutzen.

Zucht und Pflege der Tiere sollen immer in der Hand derselben Person liegen. Die Ratten sind sehr intelligent und lernen sehr bald ihren Pfleger kennen. Um sie an sich zu gewöhnen, empfehlen amerikanische und englische Autoren und auch wir selbst, sich mit den Tieren gelegentlich zu beschäftigen, mit ihnen

in freundlichem Tone zu sprechen und ab und zu auch einmal mit ihnen zu spielen. Die gut gehaltene und ernährte Ratte ist, auch wenn sie tragend ist und ihren Wurf aufzieht, ja, sogar, wenn sie eben geworfen hat, außerordentlich gutmütig und freundlich, durchaus nicht mißtrauisch und angriffslustig. Die ihr bekannte Person kann sie jederzeit mit bloßer Hand ergreifen, aus dem Käfig herausnehmen, ja selbst, ohne daß die Ratte sich feindlich zeigt, den Wurf mit bloßer Hand aus dem Käfig nehmen. Bei solcher Haltung lassen sich die Ratten auch von fremden Personen ohne Gefahr angreifen. Unbedingt notwendig ist es aber, daß die Tiere ruhig und freundlich behandelt werden, und ihnen beim Ergreifen kein Schmerz verursacht wird. Auch ist Herumjagen und Erschrecken zu unterlassen. Ganz verwerflich ist es, die Ratten mit Zangen oder anderen Instrumenten zu ergreifen, und auch das Erfassen und Hochheben an den Schwänzen ist nicht empfehlenswert, da es den Tieren Schmerzen verursachen kann und sie sich dann natürlich zur Wehr setzen. Ein Rattenbiß ist nicht angenehm, geht meist sehr tief und birgt auch Infektionsgefahren in sich. Werden die Ratten bissig, ängstlich und mißtrauisch, so ist dies ein Zeichen, daß irgendwelche Ernährungsstörungen und andere Ursachen, Mißbefinden oder Krankheiten bei ihnen bestehen.

Es ist vielleicht noch darauf aufmerksam zu machen, daß bei Hineinstecken eines Fingers durch das Drahtgitter in den Käfig auch die gutmütigste Ratte zuzubeißen pflegt, da sie annimmt, daß ihr etwas Eßbares gegeben werden soll oder etwas Feindliches auf sie eindringt. So kommt es auch, daß beim Halten der Ratten in Drahtkäfigen, die nebeneinander stehen, das Herunterhängen eines Rattenschwanzes in ein anderes Bereich häufig den Verlust dieses Körperteiles zur Folge hat.

Schließlich sei noch bemerkt, daß Säubern der Käfige, Zählen und Angreifen der Würfe oder auch der Besuch fremder Personen in der Rattenkolonie nach allgemeinen Erfahrungen niemals zum Auffressen der Jungen führt. Hierfür sind andere Ursachen (vgl. S. 1477) verantwortlich zu machen.

**d) Bekämpfung von Erkrankungen.** Auf Grund unserer 13jährigen Erfahrungen sind wir zu der Überzeugung gekommen, daß große Seuchengänge, die eine Rattenzucht zu dezimieren vermögen, zu den größten Seltenheiten gehören, wenn man nur für ausreichende hygienische Verhältnisse sorgt. Gelegentlich haben wir Pneumonien und Pseudotuberkulose der Nager beobachtet, die aber nur sporadisch auftraten.

Einmal sahen wir einen Befall mit Katzenbandwurmfinnen. Dies war dadurch hervorgerufen worden, daß eine zum Fangen von Mäusen im Institut gehaltene Katze mit diesen Bandwürmern behaftet war. Da sie in den Boden- und Lagerräumen des Institutes ihrer Pflicht nachging, hatte sie die Exkremente in einen Haufen von Sägespänen abgesetzt, die dann zur Bettung in die Rattenkäfige gegeben wurden und zur Infektion der Ratten führten. Auf solche Möglichkeiten, die scheinbar ganz fern liegen, muß aufmerksam gemacht werden, da durch sie Schädigungen der Rattenzucht zustande kommen können.

Die naheliegendste Störung des Wohlbefindens der Kolonie wird durch Befall mit Räude bewirkt. Die Räude zu bekämpfen und ständig auf ihr Vorkommen zu achten, ist deshalb eine der wichtigsten Aufgaben. Durch die oben geschilderten Maßnahmen, Einsetzen jeder trächtigen Ratte nach vorheriger Behandlung etwaiger Räudestellen mit Perubalsam in einen desinfizierten, frisch gekalkten Käfig und das häufige Wechseln der als Bettung dienenden Sägespäne gelingt es leicht, der Räude Herr zu werden. Nur in seltenen Fällen wird bei uns noch Räude angetroffen.

Häufig beobachtet man, daß die Tiere niesen oder bei der Atmung vernehmliche Geräusche von sich geben. Treten bei einzelnen Tieren solche Erscheinungen verstärkt auf, so empfiehlt es sich, sie auszumerzen. Im übrigen scheint dieses Symptom mit Reizung durch Sägespänapartikelchen, Staub, vielleicht auch Ammoniakentwicklung zusammenzuhängen und führt zu keinen

die Versuche störenden Folgen. Gelegentlich werden auch Vereiterungen des Mittelohres beobachtet, die auch auf das innere Ohr übergreifen und zu Gleichgewichtsstörungen führen können. Auch solche Tiere wird man ausschalten.

#### d) Fütterung.

Die Fütterung der Zuchtratten erfordert große Sorgfalt und muß dauernd, wenn sie in den Händen von Angestellten liegt, kontrolliert werden. Wenn Zahl und Stärke der Würfe abnehmen, und wenn die Muttertiere nicht in der Lage sind, die Würfe befriedigend aufzuziehen und die Jungen ganz oder teilweise auffressen oder töten, so sind das Anzeichen von Ernährungsstörungen. Auch scheues Verhalten, Angriffslust und Bissigkeit sind im allgemeinen Anzeichen dafür, daß mit der Ernährung irgend etwas nicht stimmt, und selbstverständlich müssen schlechtes Aussehen, struppiges Fell, Krankheiten und starker Räudebefall Veranlassung dazu sein, zunächst einmal die Zusammensetzung der Kost der Ratten nachzuprüfen. Die Ratte reagiert ungemein fein auf kleinste qualitative Mängel ihrer Kost und ebenso auf ungenügende mengenmäßige Zufuhr. Meist reagiert sie darauf mit Störungen in der Fortpflanzung und der Aufzucht. Um solche qualitativen Mängel von vornherein einzuschränken, ist auf genügenden Eiweißgehalt, auf ausreichende biologische Wertigkeit des Eiweißgemisches und vor allem auf die Verwendung solcher Nahrungsmittel zu achten, die bezüglich Eiweißqualität, Mineralstoff- und Vitamingehalt die vortrefflichsten Ergänzungseigenschaften besitzen. MCCOLLUM bezeichnet diese Nahrungsmittel als Schutznahrungsmittel. Als solche kommen für die Rattenfütterung im wesentlichen Vollmilch und grünes Gemüse in Frage. Der Eiweißgehalt muß, um befriedigende Fortpflanzung zu gewährleisten, hoch sein und sollte deshalb 15–20%, auf Trockensubstanz gerechnet, betragen.

Da aber stets zahlreiche Nahrungsmittel verwendet werden, ist es wichtig, daß aus ihnen ein so gleichmäßiges Gemisch hergestellt wird, daß die Ratten nicht mehr in der Lage sind, aus den Bestandteilen eine Auswahl zu treffen. Es würde also z. B. falsch sein, den Ratten Fleischstückchen mit Getreidekörnern und Mohrrüben und Gemüse in grober Mischung vorzusetzen. Sie suchen sich in solchen Fällen das heraus, was ihnen besonders gut schmeckt, und eine einseitige Ernährung ist die Folge. Sie fressen von diesem oder jenem Nahrungsmittel aus dem genannten Grunde so viel, daß sie nicht mehr genügend von den anderen Nahrungsmitteln aufnehmen. Die Ratten sehen dann zwar sehr wohlgenährt aus und können auch gut im Haarkleid und befriedigend hinsichtlich der Beweglichkeit sein, aber sie werden nicht mehr tragend oder vermögen die Würfe nicht mehr aufzuziehen. Wir sind auf Grund unserer Erfahrungen dazu gekommen, die Futtermischungen stets durch den Wolf zu drehen und somit gleichmäßige Mischungen herzustellen. Dies ist auch bei Versuchen mit Vitamin A und D deshalb wichtig, weil die Ratten Reserven von diesen Vitaminen aufzuspeichern vermögen, was dazu führen kann, daß die Mangelerscheinungen erst sehr spät oder jedenfalls nicht in der üblichen Versuchszeit auftreten. Sind die jungen Ratten aber einmal über ein gewisses Alter und Gewicht bei der betreffenden vitaminfreien Ernährung hinausgewachsen, so sind die Versuche nicht mehr durchzuführen oder ergeben keine einwandfreien Resultate. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten und besonders bei Arbeiten, die zur quantitativen Erfassung der Vitaminwirkung angestellt werden, ist es wichtig, die jungen Tiere mit einem möglichst geringen und gleichen Vorrat an solchen speicherungsfähigen Vitaminen in den Versuch zu nehmen. Um dies mit möglichster Sicherheit zu erreichen,

sind von verschiedenen Autoren Standard-Futtermischungen vorgeschlagen worden, die, in großer Masse auf einmal hergestellt, eine ganz gleichmäßige Fütterung der Rattenzucht über viele Monate oder 1 Jahr hinweg gewährleisten sollen.

1. Kost nach SHERMAN. Die ursprünglich von SHERMAN<sup>1</sup> angegebene Diät wird sehr häufig verwendet, um junge Ratten für Vitamin-A- und -D-Versuche zu erhalten. Sie enthält genügend Vitamin A und auch Vitamin D, um gutes Wachstum und Fortpflanzung zu sichern, so daß die Jungen im Alter von 21—29 Tagen bei einem Anfangsgewicht von 35—50 g mit geringen Vitamin-A-Reserven und beträchtlichen Reserven an Vitamin D in den Versuch genommen werden können. Diese Kost besteht aus 66% fein geschrotetem Weizen, 33% Vollmilchpulver und 1% Kochsalz. Es hat sich zur Erhöhung der Wachstumsfreudigkeit der Jungen und rascheren und besseren Fortpflanzung als zweckmäßig erwiesen, täglich jeder erwachsenen Ratte 5 g mageres Rindfleisch zuzugeben. Diese Kost nimmt nicht in Anspruch, optimal für Wachstum oder Fortpflanzung zu sein, doch sichert sie ausreichende Fortpflanzung bei der Zucht und geeignete Tiere für den Vitamin-A- und auch Vitamin-D-Nachweis. Bezüglich des letzteren Vitamins ist allerdings darauf hinzuweisen, daß unter Umständen die jungen Tiere doch zu große Vitamin-D-Reserven haben (SHERMAN<sup>1</sup>). Für Vitamin-D-Versuche empfiehlt es sich infolgedessen, andere Kostsätze zu wählen. Wir fanden die unter Nr. 3 gegebene gemischte Kost als am zweckmäßigsten.

Die Vitamin-D-Versorgung durch die genannten Kostsätze wird durch den Vitamin-D-Gehalt des Weizens (DE RUYTER DE WILDT und BROUWER<sup>2</sup>) und den der Trockenvollmilch bedingt. Da besonders die letztere bezüglich ihres Vitamin-D-Gehaltes Schwankungen aufzuweisen vermag, hat man die Mengen der Vitamin-D-Reserven nicht fest in der Hand. Auch bezüglich des Vitamins A sind Schwankungsmöglichkeiten vorhanden (Wintervollmilch, Sommervollmilch, Fütterungseinflüsse, vgl. Bd. 1, S. 816).

Bei längerer Anwendung dieser Kost haben wir mehrfach beobachtet, daß die Fortpflanzung zögernder wurde und die Würfe an Zahl zurückgingen, zum Teil auch zerstört wurden. Es ist vielleicht dann zweckmäßig, die Tiere vorübergehend auf eine gewöhnliche gemischte Kost (S. 1479) zu setzen. Mit Modifikationen und Ergänzungen, etwa durch öftere Zulage von Gemüse, kommt man zu keinen entscheidenden Verbesserungen.

2. Kost nach GUDJONSSON. Im Kopenhagener Laboratorium von FRIDERICIA hat S. V. GUDJONSSON<sup>3</sup> eine „Diet 4“ genannte Kost für Zuchtratten zum Vitamin-A-Versuch ausgearbeitet. Sie besteht aus: Magermilchpulver 30%, Reismehl 40%, autolyzierter Hefe 15%, gehärtetem Cocosnußfett mit 0,3% Haifischlebertran 15%. Das Magermilchpulver ist aus pasteurisierter Milch hergestellt und enthält etwa 1% Fett. Die Hefe wird bei 40° autolytisiert und ohne vorherige Trocknung verwendet. GUDJONSSON gibt an, daß er diese Kost über 3 Jahre erfolgreich verwendet habe.

3. Die Forschungslaboratorien der Firma E. Merck in Darmstadt und der I. G. Farbenindustrie A.G. in Elberfeld halten ihre Zuchttiere bei einer Kost folgender Zusammensetzung: Maisschrot 7, ganzer Weizen 15, Vollmilch 10, ganzer Hafer 3, Brot 5, Calciumcarbonat 0,03 und Natriumchlorid 0,06 Teile. Das Maismehl wird mit der Milch kurz aufgekocht und die übrigen Bestandteile einschließlich der Körner werden mit dem Brei zu einer leicht bröckelnden, wenig feuchten Masse gut vermischt. Je Woche erhalten die Tiere zu

<sup>1</sup> H. C. SHERMAN and S. L. SMITH: The vitamins. 2. Aufl., Chemical Catalog Company, New York 1931.

<sup>2</sup> J. C. DE RUYTER DE WILDT und E. BROUWER: Tierernährung 1932, 4, 573.

<sup>3</sup> S. V. GUDJONSSON: Biochem. Journ. 1930, 24, 1591.

diesem Futter eine Zulage von zweimal 4 g magerem, fettfreiem, gemahlenem Pferdefleisch und abwechselnd damit viermal 2 g frische Gemüse (Salat und Grünkohl). Vgl. hierzu MOLL, DALMER, v. DOBENECK, DOMAGK u. LAQUER<sup>1</sup>.

4. Wir haben die verschiedensten einfachen Standardgemische, die wir nach unseren Erfahrungen und unter Benutzung der vorstehenden und anderer Vorschriften zusammengesetzt haben, in Ernährungsversuchen durchgeprüft, ohne einen gleichbleibenden und befriedigenden Erfolg erzielen zu können. Stets stellten sich nach einiger Zeit Störungen in der Fortpflanzung heraus, und auch die Reserven der jungen Tiere an den Vitaminen A und D wiesen Schwankungen auf, die besonders dann oft sehr lästig bemerkbar wurden, wenn die Kostgemische von neuem hergestellt wurden und demgemäß neue Bestandteile zur Verwendung kamen. Wir halten infolgedessen eine gemischte Kost für die Rattenernährung für am zweckmäßigsten. Hierbei ist streng darauf zu achten, daß extrem vitamin-A- und -D-reiche Nahrungsmittel wie Lebertran vollkommen ausgeschaltet werden und daß auch frische grüne Futtermittel (Spinat, Grünkohl) nur selten und in geringen Mengen zur Verwendung kommen. Unsere gemischte Kost wird stets gekocht und durch den Wolf gedreht verabreicht. Das Kochen ist nach unseren Erfahrungen zur Erhöhung der Bekömmlichkeit, Erzielung gleichmäßigerer Mischung und Verhinderung von Infektionen wichtig. Die Kost besteht morgens aus: Brot und mit Wasser verdünnter Vollmilch ( $\frac{2}{3}$  Milch,  $\frac{1}{3}$  Wasser). Das Brot ist gewöhnliches Graubrot 70–82%ig ausgemahlen, das in große Würfel geschnitten wird. Je Ratte werden 20 g Brot und 50 ccm verdünnte Milch gerechnet. Beides wird gemeinsam in einem Näpfchen verabreicht. Mittags erhalten die Ratten dann eine gemischte Kost, die jeden Tag gewechselt und frisch zubereitet wird. Diese wird aus Fleisch, Fisch, Cerealien, Kartoffeln und anderen Wurzelgewächsen, frischem und Trockengemüse, Teigwaren u. a. so zusammengesetzt, daß je Tag 3–4 verschiedene Bestandteile verwendet und auf einen ausreichend hohen (vgl. S. 1477) Eiweißgehalt Rücksicht genommen wird. Es kommen dabei auch Futtermittel, wie Sojaschrot, Kleie, Reis, Leguminosen und gelegentlich, alle 14 Tage einmal, etwas Futterhefe zur Verwendung. Ab und zu wird etwas Seesalz und Schlammkreide, Knochenmehl oder phosphorsaurer Futterkalk zugegeben. Von diesen Gemischen erhalten die Ratten reichliche Mengen. Außerdem wird ihnen als Getränk Leitungswasser zur Verfügung gestellt. Bei der Wahl des Fleisches sind Drüsen, Herz und Leber, die außerordentlich vitamin-A-reich sind, zu vermeiden und ebenso dürfen grüne Gemüse und Möhren wegen ihres Vitamin-A-Reichtums nicht regelmäßig verwendet werden. Der Kostzettel wird täglich neu aufgestellt und ständig die Zubereitung überwacht. Wir erzielen mit dieser Kost gute Fortpflanzung, große Würfe und wüchsige Jungtiere. Die Reserven an den Vitaminen A und D, mit denen die Jungtiere in den Versuch gehen, können leicht durch passende Auswahl der Kost dem Versuchszweck entsprechend niedrig gehalten werden.

5. Ähnliche Kostsätze sind schon lange in den verschiedensten Laboratorien in Gebrauch. Für Kliniken empfiehlt es sich, die Küchenabfälle und Mahlzeitreste zu verwenden, die mit frischen Gemüsen (grüne Gemüse, Karotten u. dgl.) zweimal in der Woche ergänzt werden. Auch Hundekuchen werden statt der Küchenabfälle oder mit ihnen zusammen empfohlen. Hierbei hat man naturgemäß den Vitamin-A-Gehalt wenig in der Hand (HAWK<sup>2</sup>).

6. Man hat sich auch bemüht, solche gemischte Kostformen im wesentlichen auf Vegetabilien umzustellen und dabei gleichmäßig zusammengesetzte

<sup>1</sup> TH. MOLL, O. DALMER, P. v. DOBENECK, G. DOMAGK u. F. LAQUER: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 1933, 170, 176.

<sup>2</sup> HAWK: Practical physiological Chemistry, Philadelphia, 8. Aufl.



Gemische zu verwenden. So hat McCOLLUM<sup>1</sup> eine Kost, bestehend aus Weizenschrot 30, gequetschtem Hafer 30, Maismehl 30, Leinsamen 10, Kochsalz 0,5 und Knochenmehl 1,5 Teile empfohlen. Dieses wird in heißem Wasser zu einem Brei verrührt und  $\frac{1}{2}$  Stunde in einem geschlossenen Topf gekocht, dann durch den Wolf gedreht, daraus makkaroniartige Stangen durch Hindurchpressen durch ein entsprechendes Sieb bereitet und leicht getrocknet. Es wird dann mit etwas Vollmilch an die Ratten verabreicht. Bei regelmäßiger Fütterung ist es zu empfehlen, das Gemisch stets frisch zu bereiten und dann mit Milch anzurühren und feucht zu verabreichen. Gelegentliche Ergänzungen mit grünen Gemüsen und Fleisch dürften nach unseren Erfahrungen empfehlenswert sein.

7. Eine noch etwas komplizierter zusammengesetzte ähnliche Kost haben SMITH und CHICK<sup>2</sup> empfohlen. Sie verwenden Kuhmilch, dunkles oder weißes Brot, Cerealien, Reis, Weizen, Hafer u. a. mit frischen rohen Vegetabilien, wie Karotten, Rüben, Kohl und Spinat. Hefeextrakt wird täglich zugemischt, um die Tiere reichlich mit Vitamin B zu versorgen. Zweimal in der Woche wird außerdem rohes Rindfleisch gereicht. Die Kost bietet große Abwechslungsmöglichkeiten, die sich deshalb empfehlen, um die Tiere bei gutem Appetit und damit gleichmäßig reichlicher Futteraufnahme zu halten. Während der letzten Tage der Trächtigkeit und während der Säugeperiode erhalten die Muttertiere Milch, Cerealien und rohe Gemüse mit Hefeextraktzugaben. Nach den Erfahrungen dieser Autoren empfiehlt es sich, besonders dann mageres Rindfleisch zuzugeben, wenn die Tiere Neigung zeigen, die Jungen zu fressen.

## 2. Maus.

Mäuse sind verschiedentlich zu Vitaminarbeiten empfohlen worden, doch haben sich diese Tiere wegen ihrer Kleinheit, der Kürze ihrer Wachstumsperiode und der verhältnismäßig geringen Gewichtsunterschiede zwischen jungen und erwachsenen Tieren nicht eingebürgert. Die Unterschiede im Wachstum kommen nicht deutlich heraus, und es ist auch schwierig, bei Untersuchungen irgendwelcher Naturstoffe auf Vitamine, die davon benötigten, nur sehr kleinen Mengen in befriedigender Genauigkeit abzuwiegen und zu verabreichen. Sie werden deshalb immer nur zu speziellen Zwecken Verwendung finden können. Als Versuchstier ist die weiße Maus, die auch bei Vitaminuntersuchungen in Frage kommt, für andere Zwecke in vielen Instituten eingeführt. Ihre Zucht und Pflege ist äußerst einfach und auch weit verbreitet. Jederzeit sind auch Mäuse der in Frage kommenden Altersklasse und vom nötigen Gewicht im freien Handel und in beliebiger Menge erhältlich. Zur Zucht benutzt man hohe, mit glatten Wänden versehene, aus Holz, verzinktem Eisenblech oder Beton hergestellte Käfige oder Boxen, für die man Ausmaße in weiten Grenzen wählen kann. Für kleine Zuchten werden Maße 50:50:40 cm angegeben. Als Bettung werden Sägespäne, Holzwole, Torfmull oder ähnliches Material verwendet, und oft hat es sich als zweckmäßig erwiesen, hierüber noch eine Schicht von Heu, Haferstroh (lang gehäckselt), Papier oder Zellstoff zu geben. Die Tiere pflegen sich dann darin Gänge zu graben, ihre Nester anzulegen und sich zu verstecken. Es genügt, die Käfige in großen Zwischenräumen zu reinigen und mit neuem Unterlagematerial zu beschicken. Zweimal im Jahre empfiehlt sich eine gründliche Säuberung durch Ausschauern mit Seifenwasser und Soda. Bei größeren Käfigen ist es anzuraten, durch eine mit Löchern versehene Scheidewand einen Teil des Käfigs abzugrenzen und diesen als Futterraum zu benutzen. Dort stellt man einen Napf mit Wasser auf und streut das Futter ein. In kleinen Käfigen bringt man erhöht, durch ein Laufbrett zugänglich, ein Futterbrett an, auf dem Wasser- und Futternapf aufgestellt werden.

Zur Zucht soll in einem Zuchtkäfig ein Bock mit etwa 20 Weibchen gehalten werden. Die Tiere sind sehr fortpflanzungsfreudig. Die Tragzeit beläuft sich auf 16 Tage, so daß man häufige Würfe erhält. Es werden 4—6 Junge geworfen, und es kann bequem mit 5 Würfen im Jahre je Weibchen gerechnet werden.

Als Nahrung erhalten die Tiere trockenes Brot oder Semmel und gelegentlich Körnerfutter (Hafer, Weizen, Roggen), ferner empfiehlt sich die Zugabe von Samen des Glanzgrases (Glanz). Milch ist nur für säugende Mütter und die junge Nachzucht notwendig.

<sup>1</sup> M. J. GREENMAN and F. A. DUHRING: Breeding and care of the albino rat for research purposes. Philadelphia 1923.

<sup>2</sup> H. H. SMITH and H. CHICK: Biochem. Journ. 1926, 20, 131—136.

Die Verabreichung von Fleisch ist unnötig und nicht anzuraten. Zu beachten ist, daß nicht Tiere fremder Familien oder Zuchten einer schon länger bestehenden Zuchtfamilie beigegeben werden, da sonst leicht Kämpfe und Tötung der fremden Tiere eintreten. Es empfiehlt sich ferner, darauf zu achten, ob Junge gefressen werden. Dies würde dann das Zeichen für ungenügende Ernährung sein (KLIMMER<sup>1</sup>, KRAUS-UHLENHUTH<sup>2</sup>).

### 3. Meerschweinchen.

Zu Untersuchungen über Vitamin C werden Meerschweinchen verwendet. Ausgedehnte Versuche in dieser Richtung erfordern eine ziemlich umfangreiche Zucht, da die Meerschweinchen ziemlich lange tragen und das Heranziehen der Jungen, bis sie die nötige Größe von 250—300 g besitzen, ziemlich lange währt. Man wird deshalb häufig bei reichlichem Tierbedarf genötigt sein, Meerschweinchen anzukaufen. Hierbei ist darauf zu achten, daß man nur Tiere aus einwandfreien Zuchten erhält, die auch wirklich völlig gesund und noch nicht etwa zu anderen Versuchen verwendet worden sind.

In der Nähe von Städten, in denen sich wissenschaftliche Institute, Kliniken, Krankenhäuser und sonstige mit Tieren arbeitende Laboratorien befinden, kommen manchmal von solchen Anstalten nicht verwendete Meerschweinchen oder solche, die bereits einmal zu Versuchszwecken benutzt worden sind, zum Verkauf. Da Meerschweinchen vielfach zu biologischen Prüfungen von Krankheitserregern verwendet werden, kommt es vor, daß solche Bestände nicht ganz einwandfrei sind, sondern kranke Tiere beherbergen können. Man bekommt dann Tiermaterial in die Hände, das zwar äußerlich vollkommen gesund erscheint, aber doch irgendwie geschwächt oder gar Träger von Infektionserregern ist. Werden solche Tiere dann zu Arbeiten über das Vitamin C benutzt und auf Skorbut erzeugende Kost gesetzt, so werden bei eintretendem Vitaminmangel die latenten Krankheiten akut und die Tiere gehen sehr schnell an ihnen ein. Wir haben auf diese Weise schwere Störungen unserer Versuche erlebt. Besonders gefährlich sind solche Erkrankungen, die durch Mund- oder Nasensekret der Tiere übertragen werden können, da bei der oft notwendigen Zwangsfütterung eine Übertragung mit den dabei benutzten Instrumenten erfolgt. Auch von Käfig zu Käfig ist das Überspringen von Infektionen leicht möglich. Besonders kommen infektiöse Lungenentzündung, Pseudotuberkulose und Coccidiose in Frage.

Es kommt oft auch vor, daß über die Wintermonate, wenn grünes Material, das für die Meerschweinchen lebensnotwendig ist, fehlt, die Ernährung in der Zucht sehr kärglich ist und auch die Haltung zu wünschen übrig läßt. Dann werden die Bestände leicht mit Erkältungskrankheiten verseucht, und die Tiere sind, auch dann, wenn sie wieder aufgefüttert sind, zu Vitaminversuchen ungeeignet. Bei Ankauf von Tieren ist es also geboten, gesunde, auf dem Lande befindliche Zuchten heranzuziehen oder sich vor dem Ankauf der Tiere persönlich davon zu überzeugen, daß der betreffende Züchter wirklich in der Lage ist, einwandfreies Material zu liefern und die Tiere unter richtigen Lebensbedingungen hält und aufzieht. Es empfiehlt sich unter allen Umständen, die angekauften Tiere zunächst einige Zeit in Quarantäne zu halten. Allen solchen Schwierigkeiten entgeht man durch die eigene Zucht.

Hierzu werden die Meerschweinchen in Holz-, Draht- oder Betonkäfigen und -boxen gehalten. Wir haben auch hier wieder die besten Erfahrungen mit den gleichen Betonkäfigen, wie sie S. 1472 bei der Rattenzucht beschrieben wurden, gemacht. Zur Zucht verfährt man so, daß man die Böcke in Einzelkäfigen hält und ihnen zur Begattung 1—2 Weibchen zur Verfügung stellt. Entweder beobachtet man den Deckakt und setzt dann die begatteten Weibchen in Einzelkäfige oder man läßt die Weibchen einige Tage bei den Männchen und kann dann annehmen, daß Begattung erfolgt ist. Um Raum, Arbeit und Personal zu sparen, kann man nach unseren Erfahrungen auch so vorgehen,

<sup>1</sup> M. KLIMMER: Technik und Methodik der Bakteriologie und Serologie. Berlin: Julius Springer 1923.

<sup>2</sup> KRAUS-UHLENHUTH: Handbuch der mikrobiologischen Technik, Bd. 2, S. 1568f. Berlin und Wien: Urban & Schwarzenberg 1923.

daß man etwa 10 Weibchen und 4 Männchen in eine große Boxe zusammensetzt und dann nach etwa 14 Tagen, wenn man die ersten Anzeichen von Trächtigkeit beobachten kann, die tragenden Tiere in Einzelkäfigen isoliert. Nur am ersten Tage, wenn man die Tiere neu zusammengesetzt hat und sie sich noch nicht aneinander gewöhnt haben, kommen Beißereien, die aber nur unbedeutend sind und zu keinerlei Störungen der Zucht führen, vor. Die Meerschweinchenkäfige selbst werden mit einer Bettung von Torfmull versehen, darauf gibt man etwas Heu, an dem die Tiere nagen und in das sie sich auch zu verkriechen

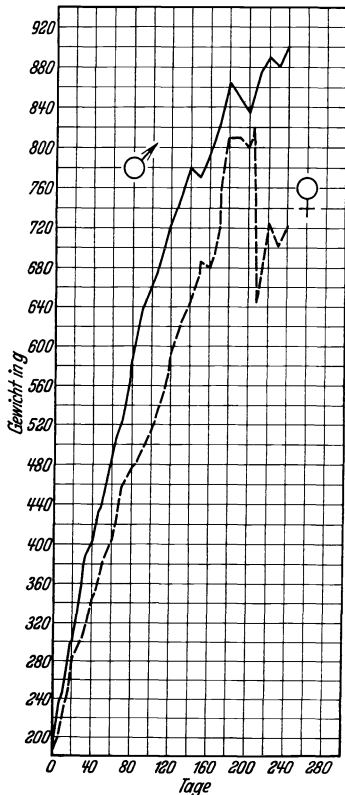


Abb. 6. Normale Wachstumskurven von Zuchtmeerschweinchen des Vet.-Physiologischen Instituts zu Leipzig.

pflanzen. In jedem Meerschweinchenkäfig sollte dann weiter mit der offenen Seite nach unten ein Kasten eingestellt werden, der je nach Größe einen oder mehrere Eingänge besitzt. Die Tiere bevorzugen diese Kästen sehr, um sich zu verstecken. In Käfigen mit reichlichem Tierbesatz kann das Dach des Kastens durch Scharniere aufklappbar gemacht werden, so daß man bequem die darin befindlichen Tiere ergreifen kann.

Die Fütterung der Meerschweinchen ist einfach, wenn man immer dafür Sorge trägt, ihnen reichliche Mengen von frischen grünen Vegetabilien zur Verfügung zu stellen. Dies ist auch im Winter leicht möglich, wenn man sich die Abfälle von Kraut und gelagerten Gemüsen aus Markthallen und von Gemüsehändlern besorgt. Besonders wertvoll und geeignet sind die vom Blumenkohl abfallenden äußeren Blätter. Als Basis der Kost bekommen die Tiere bei uns Hafer, der mit in den Institutsstallungen anfallenden Resten anderer Getreidearten vermischt werden kann. Auch Brot, gekochte Kartoffeln und Kartoffelschalen werden ihnen gelegentlich geboten. Hierzu werden Heu und frische Futtermittel gegeben. Als solche eignen sich Futterrüben aller Art, Kohlrüben, Mohrrüben, im Winter die genannten Abfälle, im Sommer außerdem jegliche Grünfuttermittel, Luzerne, Klee, Gras. Besondere Getränkzufuhr ist nicht notwendig, wenn immer frisches Material gereicht wird. Bei reiner Trockenfütterung, die aber nach gar nicht langer Zeit stets zu Skorbut

führt, muß Wasser gegeben werden. Auch für Meerschweinchen haben wir ausschließliche Stallhaltung als zweckmäßig gefunden und auch für sie sind die Ställe so einzurichten und aufzustellen, daß die Meerschweinchen nicht durch andere Tiere beunruhigt oder in der Nahrungsaufnahme gestört werden können.

Die Meerschweinchen tragen ziemlich lange. Allgemein werden 8–9 Wochen von der Begattung bis zum Werfen gerechnet. Nach genauen Untersuchungen von BEUCHELT (S. 1472) soll sich die Tragezeit jedoch im Durchschnitt nur auf 42 Tage belaufen und die Angaben über längere Dauer auf einem durch die Literatur verschleppten Irrtum beruhen. Für eine Zucht zu dem ausgesprochenen Zweck, reichliche Nachkommenschaft zu erzielen, kommt auch eine etwas kürzere Tragezeit nicht zur Auswirkung, da meist Zeit und Personal fehlen dürften, um die Zucht in ganz streng wissenschaftlichem Sinn aufziehen. Die tragenden Meerschweinchen werden in gleicher Weise unter

Berücksichtigung stets reichlicher Grünfütterzufuhr gehalten. Die Meerschweinchen werfen 2—3, in seltenen Fällen 4, manchmal sogar 5 Junge, die bereits vollkommen entwickelt sind und sehr bald mit vom Futter der Mutter zu fressen vermögen. Die Säugezeit dauert 2—3 Wochen. Nach 5 Wochen sollen bei guter Ernährung die jungen Tiere ein Gewicht von etwa 200 g erreicht haben. Es empfiehlt sich, die Tiere nach 3—4 Wochen von der Mutter zu entfernen und in gemeinsame größere Boxen, die wie die S. 1472 beschriebenen Zuchtboxen eingerichtet sind, zu verbringen. Sie werden daselbst in gleicher Weise weiter gefüttert und hieraus nach Bedarf zu Versuchszwecken entnommen. Da die Tiere erst in einem Alter von 4—6 Monaten zeugungsfähig werden, liegen gegen eine gemeinsame Haltung bis zu Versuchsbeginn, bei dem die Tiere 250—300 g schwer sein sollen, keine Bedenken vor. Es empfiehlt sich, die Meerschweinchen nicht länger als etwa 3 Jahre zur Zucht zu verwenden und die Böcke dementsprechend zu wechseln (RAEBIGER<sup>1</sup>, KLIMMER S. 1481, KRAUS-UHLENHUTH S. 1481). In Abb. 6 geben wir Wachstumskurven von Meerschweinchen aus unserer Zucht wieder.

#### 4. Taube.

Zu Versuchen über Vitamin B<sub>1</sub> sind Tauben sehr geeignet. Es empfiehlt sich, sofern ausreichender Platz und Aufzuchtmöglichkeit gegeben sind, auch diese selbst zu züchten. Als Taubenschlag eignet sich gut ein abgeteilter Bodenraum, der zur Reinigung und Entnahme der Tauben durch eine Tür zugänglich ist und eine oder zwei Ausflugsöffnungen besitzt. Diese Öffnungen müssen durch Falltüren verschließbar sein, die außerhalb des Schlages, also bei geschlossener Zugangstür, betätigt werden können. Dies ist notwendig, um die Ausflugsöffnungen vor dem Betreten des Schlages verschließen und die Tauben so aussuchen und ergreifen zu können. Die Ausflugsöffnungen sollten mit kleinen Anflugbrettern versehen sein, damit die Tauben gut ein- und ausgehen, an- und abfliegen können. Es ist zweckmäßig, wenn sich nicht allzu weit entfernt andere Gebäude oder Dächer befinden, zu denen die Tauben fliegen und sich niederlassen können, ehe sie etwa zur Futteraufnahme auf den Boden niedergehen. Bei Neueinrichtung eines Taubenschlages macht man oft die Beobachtung, daß die Tauben nicht darin bleiben, sondern entfliegen. Es ist deshalb notwendig, wenn man den Schlag erstmalig mit Tauben besetzt hat, ihn längere Zeit geschlossen zu halten, so daß die Tiere sich zunächst an den Raum gewöhnen und diesen vor allen Dingen mit ihren Exkrementen und sonstigen Körperabfällen (Federn) und auch mit Futterresten etwas verschmutzen. Die Einrichtung ist denkbar einfach; es genügen einige Sitzstangen, Sitzbretter und einige zum Nisten geeignete Holzkästen. Den Boden kann man mit etwas Sand bestreuen. Eine Reinigung empfiehlt sich nur, um eine allzu große Anhäufung von Schmutz und Exkrementen zu entfernen. An einen alten, schon benutzten Schlag gewöhnen sich die Tiere sehr schnell, sie kehren dorthin immer wieder zurück und häufig fliegen auch neue Tiere zu, die dann etwa sich einmal verfliegende Angehörige des Schlages ersetzen. Haben sich die Tauben eingewöhnt, so nisten sie auch und brüten, so daß es unter Umständen notwendig wird, allzu großer Vermehrung durch Herausnehmen von Tieren Einhalt zu tun. Daß der Taubenschlag gegen Eindringen von Katzen, Ratten u. dgl. gesichert sein muß, ist selbstverständlich.

Die Fütterung der Tauben erfolgt, wenn sie sich an den Schlag gewöhnt haben, am besten außerhalb desselben und ist denkbar einfach, da man dazu

<sup>1</sup> H. RAEBIGER: Das Meerschweinchen, seine Zucht, Haltung und Krankheiten. Hannover 1923

jegliche Getreidekörner und auch sonstige Mischungen, die als Taubenfutter im Handel erhältlich sind, verwenden kann. Das Futter wird in Näpfchen (besonders bei Fütterung im Schlag) auf den Boden aufgestellt oder ausgestreut. Auch Trinkwasser muß zur Verfügung gestellt werden, sofern nicht Wasserbassins oder fließendes Wasser in der Nähe sind. Auch anderweit beim Ausfliegen suchen sich die Tauben Futter im umliegenden Gelände zusammen.

Als Tiermaterial ist jedwede Taubenart (Feldtaube, Haustaube), die man im freien Handel billig erwerben kann, geeignet, wobei man natürlich Ziertauben, die sorgfältige Pflege verlangen, vermeiden wird.

## II. Vitamin A.

### 1. Grundlagen der Methodik.

Der Nachweis des Vitamins A baut sich auf die grundlegenden Untersuchungen von McCOLLUM und seinen Mitarbeitern und von OSBORNE und MENDEL über dieses Vitamin auf. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß junge wachsende Ratten eine vitamin-A-freie, aber sonst in allen Einzelheiten für normales Wachstum der Tiere voll ausreichende Kost erhalten und mit dieser so lange gefüttert werden, bis sich die Erscheinungen des Vitamin-A-Mangels deutlich ausprägen. Ist dies der Fall, so wird der weitere Versuch als Heilversuch, im internationalen Sprachgebrauch als „kurative Methode“, bezeichnet. Er wird derart zu Ende geführt, daß man die zu untersuchenden vitamin-A-haltigen Materialien täglich zugibt und beobachtet, ob die Mangelercheinungen verschwinden und das Wachstum wieder einsetzt.

Man kann aber auch den Versuch nach der Schutzmethode, im internationalen Sprachgebrauch „prophylaktische Methode“ genannt, durchführen. Hierzu wird das zu prüfende Material von vornherein in entsprechenden Tagesdosen neben der vitamin-A-freien Nahrung an die Tiere gefüttert. Bei genügender Zugabe wachsen die Tiere dann normal weiter, bei ungenügender Menge beginnt das Wachstum allmählich nachzulassen, um schließlich unter Entwicklung anderer Mangelercheinungen still zu stehen, worauf dann auch bald Gewichtsabfall einsetzt.

### 2. Versuchstiere.

Die jungen Ratten eines oder mehrerer Würfe werden im Alter von 23 bis 30 Tagen bei einem Gewicht von 30–35 g von der Mutter abgesetzt und mit normaler Kost, wie sie oben geschildert worden ist, einige Tage gefüttert, damit sie sich an selbständige Nahrungsaufnahme und die Abwesenheit der Mutter gewöhnen. Es ist nicht so wichtig, daß das angegebene Alter genau eingehalten wird. Wichtig ist nur, daß die Tiere nicht zu schwer sind, da sie sonst bereits sehr reichliche Reserven an Vitamin A besitzen können, die den Eintritt der Mangelercheinungen verzögern. Bei der gemischten Kost erreichen die Tiere in wenigen Tagen ein Gewicht von 40–45 g bis höchstens 50 g und sind damit versuchsreif. Schwerere Tiere sind für den Vitamin-A-Versuch meist ungeeignet, da sie ebenfalls schon zu viel Vitamin-A-Reserven aufgespeichert haben. Im übrigen kann man sich auf ganz gleichmäßige Gewichte der Versuchsratten deshalb nicht beschränken, weil auch in ein und demselben Wurf verschiedene schwere Tiere vorkommen, die Nahrungsaufnahme und damit die Wüchsigkeit wechselt und es im allgemeinen ratsam ist, zu einem Versuchszwecke die gesamte benötigte Rattenzahl gleichzeitig an ein- und demselben Tage anzusetzen. Durch Übung und Erfahrung gelingt es im übrigen bald, die Tiere gleichmäßig in den Versuch zu bringen.

Soll eine quantitative Bestimmung der Vitamin-A-Wirkung vorgenommen werden, so ist auf gleichmäßiges Tiermaterial ganz besonders zu achten, und es empfiehlt sich, die oben geschilderte Methode der vitamin-A-armen Standardfütterung der Zuchttiere durchzuführen und dann alle Würfe durch Wegnahme der überschüssigen Tiere auf eine gleiche Zahl (6 oder 8) zu bringen. Nochmals sei darauf hingewiesen, daß selbstgezüchtete Tiere für quantitative Untersuchungen unerlässlich, aber auch bei weniger genauen Untersuchungen von größtem Vorteil sind, da es für den raschen und sicheren Verlauf der Versuche von großer Wichtigkeit ist, daß die Vitamin-A-Reserven der einzelnen Tiere möglichst gleich groß sind und außerdem die Tiere auch gleiche Vitalität und Wachstumsfreudigkeit besitzen. Bei angekauften Tieren kann man das nicht überblicken. Es kommt auch vor, daß ange-

kaufte Tiere zwar mit dem verlangten niedrigen Gewicht (40–50 g) geliefert werden, aber dieses Gewicht nur deshalb besitzen, weil sie kärglich ernährt, also künstlich im Wachstum zurückgehalten worden sind. Solche Tiere haben zwar keine beträchtlichen Reserven, wachsen dann aber, auf vitamin-A-freie Kost gesetzt, die sie begierig und in großen Mengen aufnehmen, außerordentlich rasch und erreichen in wenigen Tagen unerwünscht hohe Gewichte. Wir geben als Beispiel eine Reihe von Kurven, wie sie sein sollen (Abb. 7) und wie sie nicht sein sollen (Abb. 8). Zur Frage der Aufspeicherung von Vitamin-A-Reserven sei auf Bd. 1, S. 796 verwiesen und hierzu noch angeführt, daß hohe Reserven die Versuche zum mindesten außerordentlich verlängern, weiter aber auch die Versuche überhaupt ergebnislos verlaufen lassen können. Deshalb sind ältere und schwerere Tiere von vornherein ungeeignet.

Sichere Ergebnisse sind nur dadurch zu erhalten, daß stets mehrere Ratten nebeneinander zu den Versuchen verwendet werden. Die Mindestzahl ist nach unseren Erfahrungen 3, doch empfiehlt es sich, 4 oder noch besser 5 Ratten anzusetzen. Die letztere Zahl entspricht auch etwa dem von amerikanischen Autoren geübten Brauch. Für quantitative Untersuchungen halten wir es für unerlässlich, 10 Tiere für jede zu prüfende Dosis gleichzeitig in den Versuch zu bringen.

### 3. Käfige.

Zu allen Untersuchungen müssen die Ratten in Einzelkäfigen gehalten werden. Mehrere Tiere in einem Käfig zu halten, verbietet sich schon deshalb, weil es dann schwierig ist, die Nahrungsaufnahmen zu beurteilen und besondere Vorrichtungen notwendig sind, um den Tieren die zuzuwiegende Tagesdosis der zu untersuchenden Präparate zu verabreichen. Auch durch gegenseitiges

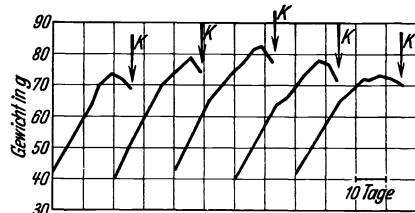


Abb. 7. Gewichtskurven von vitamin-A-frei ernährten Ratten, wie sie sein sollen. K Keratomalacie.

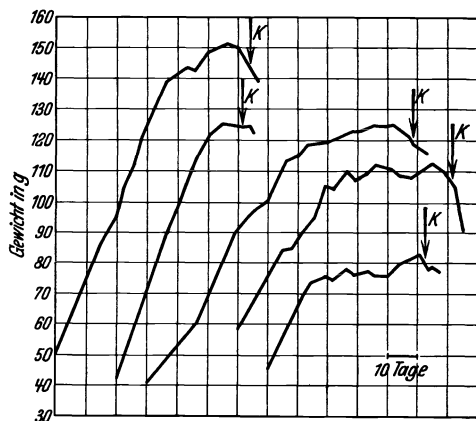
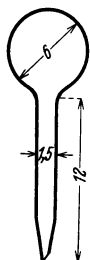


Abb. 8. Gewichtskurven von vitamin-A-frei ernährten Ratten, wie sie nicht sein sollen. K Keratomalacie.

Belecken und Inberührungkommen mit den fremden Exkrementen sind Irrtumsmöglichkeiten vorhanden.

Als Versuchskäfige werden im allgemeinen auf Vorschlag der amerikanischen und englischen Autoren runde Drahtkäfige verwendet. OSBORNE und MENDEL<sup>1</sup> benutzten runde zweiteilige Käfige. Der obere Teil ist aus verzinktem Drahtnetz von etwa 0,6 cm Maschenweite hergestellt und besitzt einen Durchmesser von etwa 23 und eine Höhe von etwa 28 cm. Der Halt wird durch Zinkblechleisten gegeben. Dieser Oberteil hat keinen Boden, sondern wird in einen runden Emaillenapf gesetzt, dessen Boden etwa 25 cm im Durchmesser mißt und dessen schräg nach oben gehende Seitenwände etwa 6 cm hoch sind. In den Boden werden 5—6 entsprechend geschnittene runde Filtrierpapierbogen gebracht, um den Harn und verschüttetes Wasser aufzusaugen. Das Papier selbst wird mit einem runden Drahtnetz mit 0,3 cm Maschenweite bedeckt. Ein Futternäpfchen aus Ton oder Porzellan und ein Trinkgefäß aus Glas oder anderem Material werden eingestellt. Die Käfige müssen

Abb. 9. Trinkwasserkölbchen aus Glas für Versuchsratten.



mindestens einmal in der Woche gereinigt werden und werden zweckmäßig mit warmem Wasser gewaschen und in Dampf sterilisiert. Selbstverständlich kann aber auch jeder andere Käfig benutzt werden. Zur Wasserzufuhr werden vielfach runde Glaskölbchen mit langem Hals, der unten etwas zugespitzt ist, verwendet (vgl. Abb. 9). Diese werden mit Wasser gefüllt und mit der Öffnung nach unten durch ein Loch in dem Deckel des Käfigs eingesteckt und ermöglichen den Tieren beliebige Wasserentnahme.

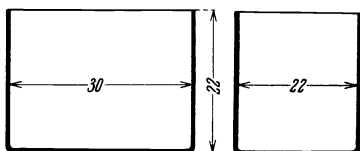


Abb. 10. Glaskäfig für Versuchsratten.

Der Vorteil, den diese Behältnisse durch Frischhaltung und Vermeidung der Verschmutzung des Wassers bieten, wird nach unserer Erfahrung dadurch ausgeglichen, daß die Ratten daran zu spielen beginnen und besonders dann, wenn der Vorrat an Wasser vermindert ist, das Wasser leicht in großen Mengen austropft und den Käfig durchnäßt. Wir sind deshalb von dieser Apparatur wieder abgekommen.

Käfige nach SCHEUNERT und SCHIEBLICH. Wir haben es als zweckmäßig gefunden, als Käfige Glasaquarien zu verwenden, die 30 cm Länge, 22 cm

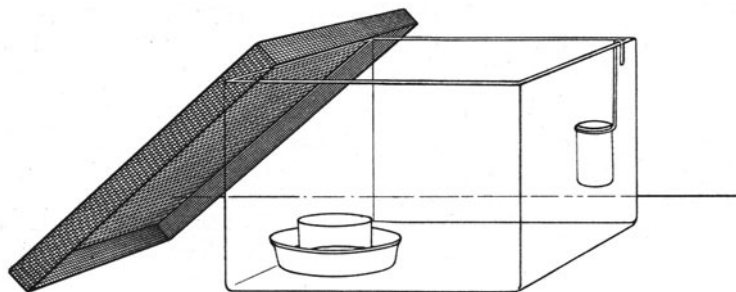


Abb. 11. Glaskäfig für Versuchsratten mit Drahtdeckel und Inneneinrichtung.

Breite und 22 cm Höhe besitzen und im Glashandel en gros billig bezogen werden können (vgl. Abb. 10). Die Glaskäfige werden mit auf einfachste Weise hergestellten Deckeln aus verzinktem Eisendraht von 4 mm Maschenweite verschlossen. Es ist wichtig, die Maschenweite nicht zu groß zu wählen, damit

<sup>1</sup> Lit. bei HAWK: S. 602; siehe oben S. 1479.

nicht Insekten wie Fliegen usw., die von der Ratte gejagt und gefressen werden und den Versuch stören können, hineingelangen (vgl. Abb. 11). Auf den Boden des Glaskäfigs wird eine dünne Lage Sägespäne gegeben, worauf sich die Ratten warm und bequem lagern können. Außerdem wird der Käfig mit einem kleinen Blumenuntersetzer aus glasiertem Ton beschickt (Durchmesser 12 cm, Höhe 3 cm), in dessen Mitte ein kleines Vogelfutternäpfchen aus Glas (Durchmesser 6 cm, Höhe 4 cm) gestellt wird (Abb. 12). In dieses kommt die vitamin-A-freie Nahrung. Die Ratten pflegen sehr unsauber zu fressen und Teile der Nahrung herauszuwühlen, diese fallen dann in den Tonuntersetzer und gehen auf diese Weise nicht verloren. Außerdem kann durch entsprechend konstruierte Blechaufsätze (Abb. 13) dem Verstreuen des Futters entgegengearbeitet werden. Als Trinkgefäß benutzen wir die üblichen in der Apotheke verwendeten Salbenkruken von 6 cm Wandhöhe und 4 cm lichtem Durchmesser (Abb. 14). Um ein Umwerfen zu vermeiden, werden diese in einen Aluminiumhalter geklemmt (Abb. 15), an dessen Stiel sich ein Haken befindet, mittels dessen der Halter an einer Käfigwand aufgehängt wird. Wenn die Käfige mit Tieren besetzt sind, ist es notwendig, die Deckel zu belasten, damit die Tiere diese nicht hochheben und hinausklettern können. Besonders große Tiere, die länger im Versuch und lebhaft sind, versuchen dies zuweilen. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, auf mehrere nebeneinanderstehende Käfige ein entsprechend langes und breites Brett zu legen. Die Verwendung der Glaskäfige hat sich nach unseren langjährigen Erfahrungen immer wieder außerordentlich bewährt. Die Tiere sitzen warm und sind vor Zug geschützt. Dies ist oft deshalb wichtig, weil an Vitaminmangel leidende Tiere gegen Zug und Verkühlung sehr empfindlich sind, und wir führen die bei Vitamin-A-Mangel häufig auftretenden Blasen- und Nierenerkrankungen zum Teil mit auf Erkältung zurück. Ist Erkältungsmöglichkeit gegeben, so treten diese auf Vitamin-A-Mangel beruhenden Erscheinungen (vgl. Bd. 1, S. 793) in verstärktem Maße und oft in großem Umfang auf. Auch die Verwendung von Sägespänen wirkt in dieser Richtung vorbeugend, und wir sind infolgedessen von der Verwendung der Drahtböden bei Vitamin-A-Versuchen ganz abgekommen, nachdem wir in mehreren Versuchen bis 90% der Tiere an solchen Blasen- und Nierenerkrankungen verloren hatten. Der gegen Käfige mit festen Wänden sich ergebende Einwand, daß bei ruhigem Verhalten der Tiere eine Anhäufung von Kohlensäure am Boden des Käfigs eintreten und dadurch Beschwerden der Tiere verursachen könnte, ist nicht zutreffend. Durch gasanalytische Untersuchung haben wir festgestellt, daß im ungünstigsten Fall am Boden des Käfigs der Kohlensäuregehalt bis zu 0,15—0,16% ansteigen kann, eine Menge, die keineswegs störend wirkt. Infolge des Drahtmaschendeckels und da die Tiere sich ab und zu auch hin- und herbewegen und oft sehr lebhaft sind, ist ausreichende Ventilationsmöglichkeit und Vermeidung von Kohlensäureanhäufung gegeben.

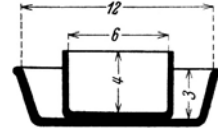


Abb. 12. Futternapf für Versuchsratten.

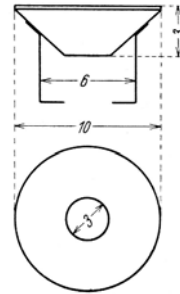


Abb. 13. Blechaufsatz, der zwecks Verhinderung des Verstreuens von Futter auf die Futternäpfe aufgesetzt wird.

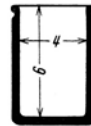


Abb. 14. Trinkgefäß für Versuchsratten.

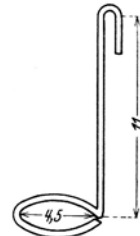


Abb. 15. Aluminiumhalter für die Trinkgefäße von Versuchsratten.



Die Glaskäfige haben den weiteren Vorteil, daß man die Tiere stets sieht und bequem jederzeit beobachten kann, ob im Käfig alles in Ordnung ist. Weiter ist die Reinigung der Käfige einfach. Wir pflegen sie in der Woche einmal zu wechseln. Es wird dann die Ratte in einen neuen Käfig übersetzt. Der alte Käfig wird ausgeschüttet und mit heißem Seifen- und Sodawasser gewaschen, dann in klarem Wasser nachgespült und getrocknet. Bruch ist natürlich nicht immer zu vermeiden, der Verschleiß ist aber gering und im Hinblick auf die geringen Kosten solcher Glasaquarien leicht zu ertragen. Näpfchen, Deckel und Wasserhalter werden in gleicher Weise gesäubert. Um auch die Übertragung von Vitaminspuren bei der Reinigung zu vermeiden, was bei der Verwendung von hochkonzentrierten Präparaten möglich erscheint, werden die für jedes Vitamin benutzten Käfige gesondert gereinigt.

Die Kennzeichnung der Käfige während des Versuches erfolgt durch ein mit dünnem Draht an dem Deckel befestigtes Pappschildchen, auf dem die Nummer der Ratte, der Tag des Beginns der Vorperiode und der Hauptperiode, sowie Art und Menge der Zulage angegeben sind.

In anderen Laboratorien sind gute Erfahrungen mit gewöhnlichen Emailletöpfen gemacht worden, die mit Deckel versehen gegen Bruch und Stoß widerstandsfähig sind und sehr bequemes Hantieren ermöglichen. Da man die Ratten hierin aber nicht sehen kann, worauf wir besonderen Wert legen, ziehen wir die, wenn auch etwas kostspieligere Verwendung von Glaskäfigen vor. Im übrigen werden in allen diesen Fragen persönliche Ansichten mehr oder weniger ausschlaggebend sein.

#### 4. Versuchsraum.

Zur Aufstellung der Versuchskäfige eignen sich am besten kleine, nicht zu hohe Laboratorien, die nur durch eine Tür zugänglich sind und in denen an den Wänden und auch im Innern die Käfige aufgestellt sind. Die Gestelle können in einfachster Weise aus Gasrohren angefertigt werden, und wenn dann die Räume mit Ölanstrich versehen oder noch besser mit Kacheln ausgelegt sind, ist eine Reinigung und Sterilisation des ganzen Raumes leicht möglich. Da die Tiere, wie schon erwähnt, gegen Temperaturschwankungen sehr empfindlich sind und stets warm gehalten werden müssen, ist die ideale Lösung durch eine Dauerheizung mit Thermoregulation gegeben, die die Raumtemperatur stets auf 22° hält. Da die Ratten über eine verhältnismäßig geringe Wärmeregulationsfähigkeit verfügen, ist für die warme Jahreszeit auch für Abkühlungsmöglichkeit Sorge zu tragen. Derartig ideal eingerichtete Laboratorien sind in den Vereinigten Staaten und in England z. B. im Lister-Institute mit Erfolg in Gebrauch. Wenn solche Einrichtungen nicht zur Verfügung stehen, muß man sich anders behelfen und versuchen, den Versuchsraum so weit wie möglich den geschilderten optimalen Verhältnissen anzugleichen.

Wir benutzen zur Aufstellung der Käfige einfache aus rohen Latten zusammengeschlagene Gestelle, auf denen die Käfige in 4—5 Reihen übereinander und mit dem notwendigen Spielraum, daß sie bequem herausgenommen werden können, aufgestellt sind. Es ist zweckmäßig, die Gestelle nicht zu hoch zu machen, damit man nicht mit Leitern und Tritten zu arbeiten genötigt ist, sondern auch ohne Anstrengung zu den oberen Käfigen gelangen kann. Da zu den Vitaminarbeiten in großem Stil in erster Linie weibliche Hilfskräfte verwendet werden, ist darauf besonders Bedacht zu nehmen. Da in Instituten mit Zentralheizung häufig nur an bestimmten Stunden des Tages geheizt wird und in Übergangszeiten, sowie an Sonn- und Feiertagen mit der Heizung gespart wird, ist es notwendig, zusätzliche Heizmöglichkeiten zu schaffen. Dazu eignen sich Gasöfen, doch sind diese etwas teuer im Betrieb und deshalb besser durch Dauerbrandöfen zu ersetzen, die man auch ohne Sorge über Nacht in Betrieb halten kann. Nach unseren Erfahrungen werden die Versuche durch Arbeiten und ständiges Hin und Her in den Laboratorien nicht gestört, doch wird natürlich gleichmäßige Ruhe und wenig Verkehr in den Räumen nur förderlich sein können.

## 5. Versuchsnaehrung.

Die vitamin-A-freie Versuchsnaehrung setzt sich aus Eiweiß, Fett, Kohlenhydrat, Salzgemisch zur Mineralversorgung und Zugaben der anderen Vitamine zusammen. Es gibt dafür ein ganz bestimmtes Schema, das sich auf die grundlegenden Arbeiten von McCOLLUM, OSBORNE und MENDEL, SHEEMAN, DRUMMOND und COWARD, STEENBOCK u. a. aufbaut und dem sich anzuschließen deshalb unbedingt empfohlen werden muß.

a) Eiweiß. Als Eiweißquelle wird Casein (nach der englischen Bezeichnung Caseinogen) verwendet. Das im Handel käufliche technische Casein oder das handelsübliche gereinigte Casein ist keineswegs für Vitaminversuche geeignet, da ihm eine noch so große Menge der Vitamine A und B anhaften, daß bei seiner Verwendung Mangelerscheinungen nicht erzielt werden können<sup>1</sup>. Für uns hat es sich immer als empfehlenswert gezeigt, das Casein selbst zu reinigen. Es ist anzuraten, das Casein in großen Quantitäten anzukaufen und dabei eine besonders feine Mahlung vorzuschreiben. Dieses technische Casein wird dann einer mehrmaligen Extraktion unterworfen. Unsere von Dr. J. RESCHKE ausgearbeitete Methode verfährt wie folgt:

Die Extraktion wird in Rundkolben unter Rückflußkühlung auf dem Wasserbade zunächst mit Trichloräthylen vorgenommen, wozu auf 700 g technisches Casein 1 Liter Trichloräthylen gegeben wird. Dieses Gemisch wird 6 Stunden kochend erhalten. Hierauf wird durch einen großen BÜCHNER-Trichter an der Luftpumpe abgesaugt, der Rückstand bei gewöhnlicher Temperatur ausgebreitet und getrocknet (Dauer ungefähr 24 Stunden) und dann dreimal wiederum je 6 Stunden mit vergälltem 94,6%igem (Petroläther 1%) Alkohol in genau der gleichen Weise und über dieselbe Dauer wie oben beschrieben, ausgekocht. Nach dem letzten Absaugen wird das Material in Emailletöpfe entleert, mit heißem Wasser reichlich versetzt und unter Umrühren auf dem Wasserbad 5—6 Stunden erhitzt. Auch diese Behandlung wird dreimal wiederholt und jeweils mit heißem Wasser nachgewaschen. Das so vorbereitete Material wird dann durch ein Drahtnetz gedrückt, um es fein zu zerteilen und endlich auf Trockenhornden ausgebreitet und über der Zentralheizung getrocknet. Das fertige Produkt stellt ein gelbbraunes Pulver dar, das weder fettlösliche noch wasserlösliche Vitamine enthält und damit zu allen Vitaminversuchen benutzt werden kann.

Andere Methoden zur Entfernung der Vitamine aus Casein bedienen sich der allerersten, von OSBORNE und MENDEL<sup>2</sup> gegebenen Vorschrift des mehrfachen Auskochens mit Alkohol. Dazu werden 200 g fein gemahlene, lufttrockene Casein in einer 2 Liter-Kochflasche mit  $\frac{1}{2}$  Liter 95%igem Alkohol vermischt und 1 Stunde mit Rückflußkühler auf dem Wasserbade gekocht. Dann wird rasch heiß abgenutzt und diese Behandlung noch zweimal wiederholt. Nach der Lufttrocknung bei Zimmertemperatur erhält man ein vitamin-A-freies Material. Bei nicht geeignetem, vor allem grobkörnigem Casein kann man hierbei Enttäuschungen erleben.

Eine weitere Methode bedient sich der oxydativen Zerstörung des Vitamins A durch langdauernde Erhitzung im Trockenofen (POTTER<sup>3</sup>). Hierbei wird gewöhnliches Handels-casein in dünner Lage im elektrischen Ofen 7 Tage lang auf 110° erwärmt und durch tägliches Umrühren für gute Durchlüftung gesorgt. Infolge der hohen Temperatur nimmt das Casein rötliche bis braune Farbe an. Geschmack und Verdaulichkeit sollen dadurch nicht beeinträchtigt werden.

An Stelle von Casein haben verschiedene Autoren auch andere Eiweißquellen benutzt, z. B. Fleischpulver oder auch vitamin-A-freie Rationen aus Gemischen solcher natürlicher

<sup>1</sup> Für Vitaminversuche gereinigtes Casein liefern die Firmen: Chemische Fabrik Merck, Darmstadt; Glaxo Research Laboratory, London N. W. 1; The Harris Laboratories, Inc., Tuckahoe, N. Y., U. S. A.

<sup>2</sup> T. B. OSBORNE and L. B. MENDEL: Journ. Biol. Chem. 1921, **45**, 277.

<sup>3</sup> M. T. POTTER: Science (N. Y.) 1932 II, 195.

Nahrungsmittel hergestellt, die bekanntermaßen kein Vitamin A enthalten. Im letzteren Fall hat man keinen Überblick über den Gehalt an den anderen lebenswichtigen Nährstoffen und bezüglich des Fleischmehles wechselt das im Handel befindliche Material häufig seine Qualität und Zusammensetzung, namentlich hinsichtlich des Mineralstoffgehaltes (Knochenbestandteile). Casein bleibt somit unter allen Umständen die zweckmäßigste Eiweißquelle.

b) **Kohlenhydrat.** Zur Versorgung mit Kohlenhydraten wird ganz allgemein Stärke verwendet. Nach den Erfahrungen der verschiedenen Institute eignen sich dazu alle reinen Stärkearten, insbesondere finden aber Maisstärke, Reisstärke und auch Kartoffelstärke Verwendung. Die Hauptsache ist, daß man schon ein bei der technischen Herstellung gut gereinigtes und ausgewaschenes Produkt bekommt. Reis- und Kartoffelstärke können dann in Vitamin-A-Ver suchen ohne weitere Extraktion verwendet werden, da in den Ausgangsprodukten kein Vitamin A vorhanden zu sein pflegt. Bei Maisstärke wird, falls diese aus gelbem Mais hergestellt worden ist, eher etwas Vitamin A anwesend sein können (vgl. Bd. I, S. 809).

Wir benutzen seit Jahren Maisstärke, weil diese von den Maizenawerken in großer Reinheit dargestellt wird und sich nach unseren Erfahrungen als sehr gut geeignet erwiesen hat. Auch diese Stärke wird einer Extraktion unterworfen, um sie nicht nur von möglichen Vitamin-A-Spuren, sondern auch von Vitamin B zu befreien, so daß wir für alle in Frage kommenden Vitaminversuche ebenso wie beim Casein ein von allen Vitaminen sicher befreites Material zur Verfügung haben.

Als Ausgangsmaterial dient das unter dem Namen Sirona-Maispuderstärke in den Handel gebrachte Produkt der Deutschen Maizena-Gesellschaft. 500 bis 1000 g dieser Stärke werden mit 1 Liter vergälltem (Petroläther 1%) 94,6% igem Alkohol 5–6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und dann im BÜCHNER-Trichter bis zu völlig fester Konsistenz an der Luftpumpe heiß abgesaugt. Dazu ist es notwendig, die Stärke ständig mit einem Messer zu zerteilen. Anschließend wird die Stärke bei gewöhnlicher Temperatur auf Filtrierpapier ausgebreitet und getrocknet und dann zur weiteren Zerkleinerung durch ein Drahtnetz gedrückt. Sie ist dann versuchsbereit.

Die ausländischen Vitaminforscher benutzen vielfach nicht die rohe Stärke, sondern sie dextrinisieren sie vorher. Dies geschieht in einfachster Weise durch längeres Erwärmen der Stärke auf 212–275°, was in einem gewöhnlichen Trockenofen geschehen kann. Man kann natürlich auch ein anderes der üblichen Dextrinisierungsverfahren mit Säure anwenden, wenn man die Stärke in Breiform verwenden will; naturgemäß ist sie dann nur kurze Zeit haltbar. Diese Schwierigkeit kann man durch anschließende Trocknung, die aber wieder Zeit und Kosten erfordert, vermeiden.

c) **Fett.** α) **Pflanzliche Fette.** Als Fettanteil in der vitaminfreien Kost kann jedes gehärtete reine Pflanzenfett verwendet werden. In den ausländischen Laboratorien wird vielfach gehärtetes Cocosnußfett benutzt. Wir verwenden das in Deutschland in Tafelform in jeder Lebensmittelhandlung erhältliche Palmin. Um jegliche Möglichkeit des Vorhandenseins von Spuren von Vitamin A auszuschließen, wird das Palmin in einem Emailletopf über dem BUNSEN-Brenner geschmolzen, auf etwa 150–165° erhitzt und 8 Stunden lang mit einem langsamen Luftstrom durchlüftet. Auf die gleiche Weise empfiehlt es sich, jegliche anderen Pflanzenfette vorzubereiten.

β) **Tierische Fette.** Vielfach wird auch Schweineschmalz empfohlen. Dieses wird geschmolzen, in absolutem Alkohol verteilt und auf 60° erwärmt. Man läßt dann über Nacht abkühlen und saugt ab. Der Vorgang muß dreimal wiederholt werden, dann schließt sich eine Trocknung in einer Blechschale auf dem Wasserbade an. Dieses etwas umständliche Vorgehen kann nach unseren Erfahrungen mit Vorteil durch mehrstündiges Durchlüften in geschmolzenem Zustand ersetzt werden.

d) **Vitaminzufuhr.**  $\alpha$ ) Vitamin D. Beim Vitamin-A-Versuch ist es unbedingt notwendig, die vitamin-A-frei ernährten Ratten mit den von ihnen benötigten anderen Vitaminen ausreichend zu versorgen, da sie sonst auf Vitamin-A-Zugabe nicht zu wachsen vermögen. Insbesondere darf auch nicht die Zufuhr an antirachitischem Vitamin D vernachlässigt werden. Hierzu verfährt man derart, daß man dem, wie oben beschrieben, durchlüfteten Fett vor dem Abkühlen, also in flüssigem Zustande, Vitamin D zusetzt. Dies geschieht am besten in Gestalt von Vigantol, und zwar setzt man auf 300 g Fett 0,1 ccm Vigantol zu. Zur Abmessung empfiehlt es sich, das Vigantol in Sesamöl 10fach zu verdünnen und dann 1 ccm zu nehmen.

$\beta$ ) Vitamin B. Zur Zugabe der Vitamine der B-Gruppe verwendet man Hefe oder Hefepräparate. Unter den in ausländischen Laboratorien benutzten verschiedenen Hefepräparaten steht das als „Marmite“ bezeichnete wohl an erster Stelle. Ihm würde der bei uns in Deutschland im Handel erhältliche ungesalzene Hefeextrakt der Cenovis-Werke entsprechen. Wir bedienen uns einer für menschliche Genußzwecke im Handel befindlichen Biertrockenhefe dieser Werke. Um ganz sicher zu gehen, daß nicht doch Spuren fettlöslicher Vitamine, insbesondere Vitamin A, darin enthalten sind, extrahieren wir die Trockenhefe mit Äther, wovon 1 Liter auf 500 g Hefe verwendet wird. Die Extraktion erfolgt durch 2–3stündiges Erhitzen unter Rückfluß auf dem Wasserbade. Dann wird erkalten gelassen und der Äther am BÜCHNER-Trichter abgesaugt. Nach Trocknung bei gewöhnlicher Temperatur und entsprechend feiner Zerkleinerung, am besten mit Hilfe eines Nudelholzes, ist die Hefe verwendungsfähig.

e) **Salzgemisch.** Zur Sicherung der Mineralsalzversorgung wird der vitaminfreien Kost ein Salzgemisch zugefügt. Vorschriften zur Herstellung solcher Salzgemische finden sich in der Literatur ziemlich zahlreich. Die am häufigsten verwendeten Salzgemische dieser Art geben wir im folgenden wieder:

$\alpha$ ) Salzgemisch Nr. 185 nach McCOLLUM und DAVIS<sup>1</sup>:

|   |         |
|---|---------|
| Natriumchlorid (NaCl) . . . . .   | 0,173 g |
| Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> , wasserfrei) . . . . .  | 0,266 g |
| Mononatriumphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O) . . . . .                           | 0,347 g |
| Dikaliumphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) . . . . .   | 0,954 g |
| Monocalciumphosphat (CaH <sub>4</sub> [PO <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O) . . . . .           | 0,540 g |
| Calciumlactat (Ca[C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> + 5 H <sub>2</sub> O) . . . . . | 1,300 g |
| Eisenlactat (Merck) . . . . .   | 0,113 g |

Wir ergänzen dieses Salzgemisch durch Zugabe von Kaliumjodid und Mangansulfat in Spuren.

$\beta$ ) Salzgemisch nach OSBORNE und MENDEL<sup>2</sup>:

|   |          |
|---|----------|
| Calciumcarbonat (CaCO <sub>3</sub> ) . . . . .  | 13,48 g  |
| Magnesiumcarbonat (MgCO <sub>3</sub> ) . . . . .  | 2,42 g   |
| Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) . . . . .  | 3,42 g   |
| Kaliumcarbonat (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) . . . . .  | 14,13 g  |
| Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) . . . . .   | 10,32 g  |
| Salzsäure (HCl) . . . . .   | 5,34 g   |
| Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) . . . . .   | 0,92 g   |
| Citronensäure (+ H <sub>2</sub> O) . . . . .  | 11,11 g  |
| Eisencitrat (+ 1,5 H <sub>2</sub> O) . . . . .  | 0,634 g  |
| Kaliumjodid (KJ) . . . . .  | 0,0020 g |
| Mangansulfat (MnSO <sub>4</sub> ) . . . . .   | 0,0079 g |
| Natriumfluorid (NaF) . . . . .  | 0,0062 g |
| Kalium-Aluminiumsulfat (K <sub>2</sub> Al <sub>2</sub> [SO <sub>4</sub> ] <sub>4</sub> + 24 H <sub>2</sub> O) . . . . . | 0,0024 g |

<sup>1</sup> E. V. McCOLLUM and M. DAVIS: Journ. Biol. Chem. 1915, 20, 641.

<sup>2</sup> T. B. OSBORNE und L. B. MENDEL: Zeitschr. physiol. Chem. 1912, 80, 307. — Journ. Biol. Chem. 1913, 15, 311.

Bei der Darstellung dieses Salzgemisches werden von den Bestandteilen zunächst die verschiedenen Säuren in etwa 450 ccm Wasser gelöst und dieser Lösung dann das Calcium- und Magnesiumcarbonat zugefügt. Nach Auflösung dieser Salze wird eine inzwischen aus den übrigen Bestandteilen in etwa 100 ccm Wasser dargestellte Lösung der ersten beigemischt. Die resultierende milchige, leicht alkalisch reagierende Flüssigkeit wird dann bei etwa 70° eingedampft.

γ) Eine Modifikation des Salzgemisches von OSBORNE und MENDEL, die leichter herstellbar ist, wird von HAWK und OSER<sup>1</sup> angegeben:

|   |          |           |
|---|----------|-----------|
| Calciumcitrat (+ 4 H <sub>2</sub> O) . . . . .  | 309,67 g |           |
| Tricalciumphosphat (Ca <sub>3</sub> [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O) . . . . .        | 113,25 g |           |
| Dikaliumphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) . . . . .   | 219,72 g |           |
| Kaliumchlorid (KCl) . . . . .   | 125,29 g |           |
| Natriumchlorid (NaCl) . . . . .   | 77,41 g  |           |
| Calciumcarbonat (CaCO <sub>3</sub> ) . . . . .  | 68,90 g  |           |
| Magnesiumcarbonat (MgCO <sub>3</sub> ) . . . . .  | 33,43 g  |           |
| Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> , wasserfrei) . . . . .  | 38,50 g  |           |
| Eisencitrat (+ 1.5 H <sub>2</sub> O) . . . . .  | 94,18 g  | } 13,80 g |
| Natriumfluorid (NaF) . . . . .  | 3,68 g   |           |
| Mangansulfat (MnSO <sub>4</sub> ) . . . . .   | 1,17 g   |           |
| Kalium-Aluminiumsulfat (K <sub>2</sub> Al <sub>2</sub> [SO <sub>4</sub> ] <sub>4</sub> + 24 H <sub>2</sub> O) . . . . . | 0,67 g   |           |
| Kaliumjodid (KJ) . . . . .  | 0,30 g   |           |

4,4 g dieses Gemisches entsprechen 4,0 g des Gemisches nach OSBORNE und MENDEL.

f) **Cellulosezusatz.** Vor allem in früheren Zeiten ist vielfach empfohlen worden, den Tieren zur Anregung der Darmperistaltik Cellulose zum Futter zuzumischen. Es wurde dazu aschefreies Filtrierpapier in Mengen von 5% empfohlen (ARON und GRALKA<sup>2</sup>). Von anderer Seite ist Agar-Agar verwendet worden. Nach unseren Erfahrungen werden hierdurch keine Vorteile erzielt, und man kann deshalb von diesen Zusätzen absehen.

g) **Vitamin-A-freies Futtergemisch, seine Herstellung und Fütterung.** Unter Zuhilfenahme der wie vorstehend geschildert gereinigten Bestandteile wird das vitamin-A-freie Futtergemisch zusammengestellt. Man verwendet dazu 18—20% Casein, 15% Palmin (mit Vitamin-D-Zusatz), 55—57% Stärke, 5% Salzgemisch Nr. 185 nach McCOLLUM und DAVIS, 5% Trockenhefe. Zum Zusammenmischen benutzt man eine große Emailleschüssel und gibt in diese zunächst die trockenen Bestandteile, die mit der Hand gründlich durchmischt werden, und fügt dann das Fett in geschmolzenem Zustand hinzu. Nach guter Durchmischung wird das Material zweimal mit der Hand durch ein Sieb gedrückt, um ihm pulverförmige Beschaffenheit zu geben. Es empfiehlt sich, je nach Bedarf etwa 3—6 kg vorzubereiten, die dann, in sauberen Glaskäfigen als Behältnis aufbewahrt, den Bedarf für etwa 14 Tage decken. Die Herstellung größerer Vorräte empfiehlt sich wegen der Gefahr des Ranzigwerdens nicht.

In amerikanischen Laboratorien ist vielfach empfohlen worden, die vitamin-A-freie Kost durch Verwendung von Wasser oder Erhöhung des Fettanteiles bei Verminderung der Stärke in Pastenkonsistenz zu bringen, um dadurch das Verstreuen des Futters zu verhindern. Solches Futter hält sich naturgemäß nicht sehr lange. Man kann es auch in weite Glasröhren füllen und den Ratten durch eine Öffnung in der Seitenwand des Käfigs, in die das Rohr paßt, anbieten. Die Tiere können dann nur mit dem Kopf zu dem Futter gelangen. Zum Nachschieben der Futtersäule kann ein Stempel verwendet werden. In unserem Laboratorium hat sich die trockene Verabreichung mit Hilfe der oben beschriebenen ineinandergesetzten Nöpfchen als zweckmäßig erwiesen.

ARON und GRALKA<sup>3</sup> haben vorgeschlagen, die vitaminfreie Nahrung in kleine Kuchen zu backen. Dazu wird die, wie oben geschildert zunächst in einer Emailleschüssel vermischte

<sup>1</sup> P. B. HAWK and B. L. OSER: Science (N.Y.) 1931 II, 369.

<sup>2</sup> H. ARON und R. GRALKA: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 9, S. 145. 1925.

<sup>3</sup> H. ARON und R. GRALKA: OPPENHEIMERS Handbuch der Biochemie, 2. Aufl., Bd. 6. 1924.

Nahrung nach Zusatz von Wasser zu einem etwa  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  cm dicken Teig ausgewalzt und daraus mit einer kleinen runden Blechform, wie sie zu Backzwecken käuflich ist, kleine runde Kuchen im Durchmesser von 3 cm ausgestochen. Diese werden dann auf einem Kuchenblech in einem Trockenofen bis zur Trocknung und harten Konsistenz leicht gebacken. Die kleinen Kuchen können in Pulverflaschen aufbewahrt werden, sind gut haltbar und werden den Ratten direkt vorgelegt. Sie bieten ihnen auch Nagelegenheit. Allerdings wird dadurch das Verstreuen der Nahrung keineswegs vermieden, weil die Tiere mit den Kuchen herumspielen und beim Fressen stets mehr oder weniger große Teile abbröckeln, die dann unter die Bettung geraten und verloren gehen. Ferner bedingt das Backen immerhin eine nicht unbedeutende Arbeitsbelastung, die man bei der an und für sich schon großen Kleinarbeit, die alle Vitaminversuche erfordern, gern vermeiden wird.

Erscheint es notwendig, eine quantitative Aufnahme des Futters zu sichern, so muß man die Tiere ohne Einstreu auf etwas erhöhte Drahtunterlage setzen und das etwa verstreute und durchgefallene Futter zurückzuwiegen versuchen. Um dies zu erleichtern, legt man einige Lagen Fließpapier in den Käfig, die den Harn aufsaugen, während man die Kotballen leicht zu entfernen vermag. Natürlich ist diese Methode trotz allem mit Ungenauigkeiten verknüpft. Deshalb sind verschiedentlich Einrichtungen beschrieben worden, die in der Art von Futterautomaten für Geflügelfütterung oder in irgendeiner Form so angeordnet sind, daß die Ratten nur durch ein Rohr zum Futter gelangen, dieses aber nicht mit den Vorderextremitäten erreichen können.

Alle solche Einrichtungen, von denen auch wir die verschiedensten ausprobiert und selbst neu konstruiert haben, vermögen aber eine quantitative Aufnahme nicht zu sichern und sind außerdem kostspielig und unhandlich. Die Ratte ist so beweglich und gewandt, hat auch während der Versuche so viel Zeit und Langeweile, daß sie es doch immer wieder fertig bringt, das Futter herauszuwühlen und auch mit Exkrementen zu beschmutzen.

Gegen die Verunreinigung, die dabei zustande kommt, daß die Ratten beim Fressen oder Herumklettern im Käfig auch den Futternapf besteigen, hat McCOLLUM (zit. nach GREENMAN und DUHRING, s. oben S. 1472) eine Einrichtung empfohlen, die an der Decke des Käfigs aufgehängt wird (Abb. 16). Hierdurch werden die Ratten am Hinaufsteigen verhindert, und es soll auch Verstreuen des Futters vermieden werden. Am besten sind die für Stoffwechselversuche bei Ratten beschriebenen Einrichtungen zu verwenden (VÖLTZ<sup>1</sup> [vgl. Abb. 17]). Den Chemiker befriedigendes quantitatives Arbeiten dürfte aber trotzdem nur unter ungeheuren Schwierigkeiten zu erreichen sein.

Für die Vitaminversuche dürften solche Einrichtungen entbehrt werden können. Um einen Einblick in die quantitative Futteraufnahme, die für die durchschnittlichen Erfordernisse der Vitaminversuche genügt, zu erlangen, sind die eingangs erwähnten Vorsichtsmaßregeln ausreichend.

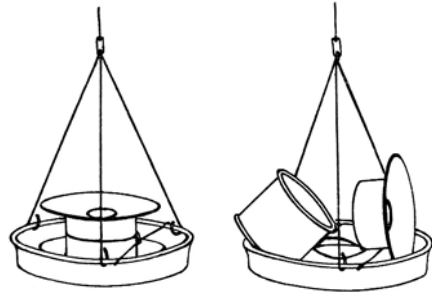


Abb. 16.  
Aufhängbare Fütterungsvorrichtung für Versuchsratten nach McCOLLUM.

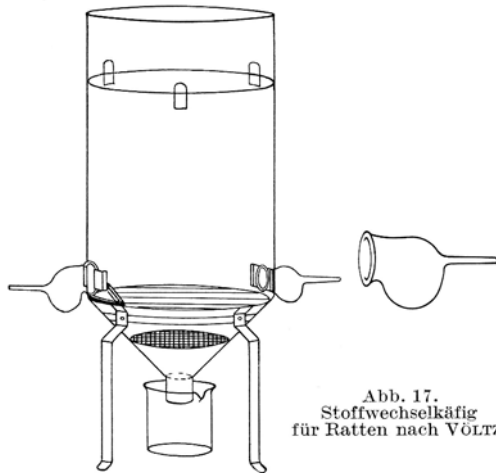


Abb. 17.  
Stoffwechsellkäfig für Ratten nach VÖLTZ.

<sup>1</sup> W. VÖLTZ: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 9, S. 324. 1925.

Die Futternäpfechen werden täglich mit Futter ergänzt und beim Wechseln der Käfige die Reste entfernt und ein neues Näpfechen verwendet. Die Ratten nehmen von dem vitamin-A-freien Futter je nach Größe und Beifütterung 5–10 g täglich auf. Bei sehr großen Tieren kann der Verzehr noch wesentlich ansteigen und die Futterbeschaffung erschweren; deshalb ist stets für genügenden Vorrat zu sorgen.

Als Getränk wird den Tieren täglich frisches Leitungswasser verabreicht. Es ist besonders sorgfältig darauf zu achten, daß die Tiere hiermit gut und regelmäßig, auch über Nacht, versorgt werden. Da die Temperatur des Versuchsraumes hoch sein soll, tritt rasche Verdunstung ein und die Tiere können dadurch leicht Durst leiden, was unbedingt vermieden werden muß. Auch Sonntags ist deshalb Ergänzung nötig.

## 6. Durchführung des Versuchs.

Die zu den Untersuchungen ausgewählten Ratten werden zu qualitativen Versuchen in einer Anzahl von mindestens 3–5 Stück, zu quantitativen Versuchen in Reihen zu 10 Stück in Einzelkäfigen und möglichst an demselben Tag angesetzt. Vielfach werden bei kleineren Versuchen Ratten desselben Wurfes genommen. Da für jedweden umfangreichen Versuch ein Wurf niemals genügend stark ist, um alle Vergleichsserien dadurch zu decken, müssen mehrere Würfe herangezogen werden. Wenn man eine ausgeglichene Zucht hat, werden hierdurch keinerlei Unsicherheiten bedingt, sofern die Ratten gleichartig — 22–35 (große Würfe) Tage alt — und gleich schwer — 40–45, höchstens 50 g — sind. Man wird dann zweckmäßig so verfahren, daß man die Würfe gleichmäßig auf die verschiedenen Vergleichsgruppen verteilt. Hierbei ist besonders auf das Geschlecht zu achten, da Männchen im allgemeinen besser wachsen als Weibchen. Besondere Sicherheit wird dadurch gewonnen, daß man durchweg gleichgeschlechtliche Tiere, am besten Männchen, für sämtliche Versuchsgruppen verwendet. Eine Notwendigkeit besteht aber dafür nicht.

**Erscheinungen des Vitamin-A-Mangels, Xerophthalmie, Keratomalacie.** Die, wie oben genau beschrieben, in den Versuchskäfigen untergebrachten und gefütterten Ratten werden zu Beginn des Versuchs gewogen. Die Wägung wird während der ganzen Dauer des Versuchs zweimal wöchentlich, also etwa Dienstag und Freitag, wiederholt und die Gewichte auf Millimeterpapier (vgl. S. 1498) zur Erzielung von Wachstumskurven eingetragen. Die Tiere wachsen bei geringen Vitamin-A-Reserven 20–30 Tage, stehen dann im Gewicht still und beginnen anschließend langsam abzunehmen. In ihrem Verhalten ändert sich zunächst nichts. Der Zeitpunkt des Eintretens des Gewichtsstillstandes kann sich bei Vorhandensein deutlicher Vitamin-A-Reserven mehr oder weniger lange hinauszögern, so daß auch 40, 50 und mehr Tage vergehen können, oder selbst monatelang ein Hinschleppen der Kurve unter ganz allmählichem Anstieg eintreten kann. Große Vitamin-A-Reserven zeigen sich auch darin an, daß der anfängliche Gewichtsanstieg sehr steil und rasch erfolgt. Tiere, die in wenigen Tagen Gewichte von 100 g und mehr erreichen, schaltet man am besten aus, ebenso solche, die nach mehr als 50 Tagen noch immer Gewichtsanstieg zeigen (vgl. hierzu die Abb. 7 und 8, S. 1485). Es ist in solchen Fällen notwendig, die Kost der Zuchtratten (vgl. S. 1477) vitamin-A-ärmer zu gestalten. Fast regelmäßig wird man mit solchen Störungen rechnen können, wenn man schwerere Tiere mit mehr als 50 g in den Versuch nimmt. Selbstverständlich treten solche Störungen auch ein, wenn die Versuchskost infolge ungenügender Extraktion nicht völlig vitamin-A-frei ist.

Mit der allmählichen Abnahme des Wachstums bilden sich auch die anderen Erscheinungen des Vitamin-A-Mangels aus. Diese machen sich in Verschlechterung des Aussehens der Tiere und insbesondere in der Abnahme des Turgors, den man beim Aufnehmen der Tiere mit der Hand an der Spannung des Tierkörpers feststellen kann, bemerkbar. Die Tiere werden weich und schlaff. Noch ehe Gewichtsstillstand erfolgt, manchmal aber auch noch einige Tage später, beginnt sich die typische Mangelerscheinung (Xerophthalmie, Keratomalacie) zunächst an den inneren Augenwinkeln bemerkbar zu machen. Diese sehen entzündet aus, und bald bemerkt man Absonderung von blutig-serösem Sekret. Als bald werden die entzündlichen Erscheinungen deutlicher, und es tritt völlige oder teilweise Verklebung der Lidränder ein. Die Cornea beginnt sich zu trüben, und schließlich scheint der ganze Augapfel gelblich verfärbt (vgl. Abb. 18 und



Abb. 18. Normales Auge einer Ratte. (Nach GUDJONSSON<sup>1</sup>: Acta ophthalm. (Københ.) 1932, 8.)

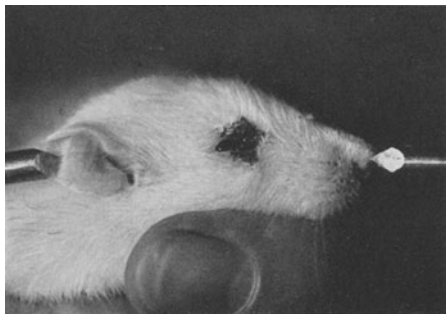
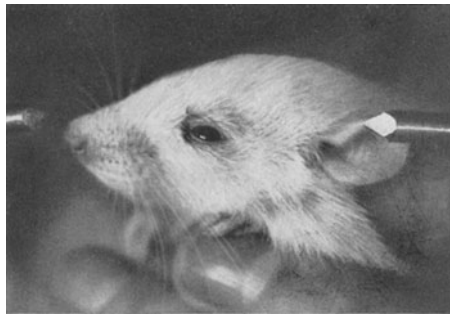
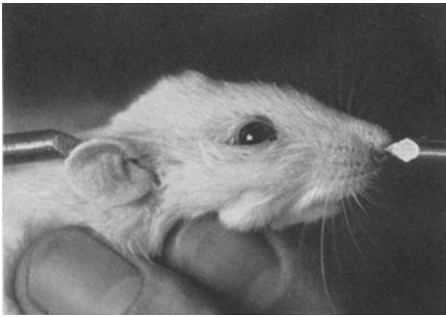


Abb. 19. Verschiedene Stadien der Xerophthalmie. (Nach GUDJONSSON: Acta ophthalm. (Københ.) 1932, 8.)

Abb. 19). Zur Feststellung der Keratomalacie genügt nach unseren Erfahrungen makroskopische Betrachtung vollauf. Erscheint eine besonders frühe Diagnose der ersten mikroskopisch erkennbaren Symptome angezeigt, so leistet

<sup>1</sup> Die Abb. 18—22 wurden uns von Herrn GUDJONSSON in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt.



eine Betrachtung unter einem binokulären Mikroskop oder einer Lupe gute Dienste. Bei mikroskopischer Betrachtung unter der Spaltlampe kann man nach MOURIQUAND, ROLLET und CHAIX<sup>1</sup> die ersten Veränderungen (leicht fleckige Trübung der vorderen Hornhautschichten und Verdickung der Hornhaut) bereits 7–19 Tage vor dem makroskopischen Sichtbarwerden erkennen. Besitzen die Ratten zu Beginn des Versuchs nur geringe Vitamin-A-Reserven, so tritt die Xerophthalmie eigentlich in allen Fällen ein. Nur selten finden sich Tiere ohne diese Erkrankung. Bei weniger sorgfältig vorbereiteten Tieren kann der Prozentsatz der nicht an Xerophthalmie erkrankten Ratten größer sein. Es ist nicht notwendig, sie auszuschalten. Man kann allgemein etwa annehmen, daß, wenn die Tiere 14 Tage keine Gewichtszunahme mehr gezeigt haben, der Vitamin-A-Mangel so deutlich dargetan ist, daß nunmehr mit der Zulage eines auf Vitamin-A-Wirkung zu prüfenden Präparates begonnen werden kann. Im übrigen kann man für diesen Zeitpunkt eine bestimmte Regel nicht geben. Übung und Erfahrung sind hier die besten Lehrmeister. Wartet man zu lange mit der Zugabe, besonders wenn der Gewichtsabfall schon erheblich gewesen ist, so können die Tiere in ganz kurzer Zeit zugrunde gehen oder so geschädigt sein, daß sie auf Vitamin-A-Zulage nicht mehr zu reagieren vermögen.

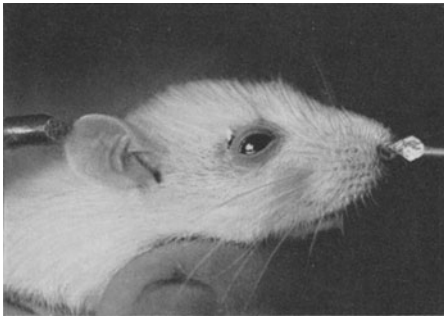


Abb. 20. Periokulare Reaktion.  
[Nach GUDJONSSON: Acta ophthalm. (Köbenh.)  
1932, 8.]

Ferner ist daran zu denken (vgl. Bd. I, S. 793), daß neben den geschilderten Mangelerscheinungen Infektionskrankheiten eintreten können, insbesondere kommen Vereiterung der Nasen- und Stirnhöhlen, Pneumonie, Blasenentzündung mit Steinbildung

und hämorrhagische Magendarmentzündung in Frage. Man muß die Tiere deshalb in den kritischen Tagen sehr genau beobachten und täglich wägen, damit sie nicht durch solche Erkrankungen so schwer geschädigt werden, daß der Versuch in Frage gestellt wird. Die Tiere erhalten das zu prüfende Material, sofern es fest ist, zugewogen, sofern es flüssig ist, mit der Pipette eingegeben, wobei das Tier von einer Hilfsperson am Genick erfaßt und in Rückenlage gehalten wird. Größere Mengen von Flüssigkeit werden entweder mit Hilfe eines elastischen Katheters direkt in den Magen eingebracht oder sind in vitamin-A-freier Nahrung aufzusaugen und vorzusetzen. Im allgemeinen nehmen die vitamin-A-verarmten Ratten das vitamin-A-haltige Material, welcher Art es auch sei, gern auf.

Tun sie es nicht, so muß man verschiedene Kunstgriffe anwenden, um es ihnen beizubringen. Solche sind z. B. Entfernung des gewöhnlichen Futters über Nacht aus dem Käfig, so daß nur das aufzunehmende Material zur Verfügung steht, Vermischen des Materials mit Honig oder Zucker unter gleichzeitigem Zusatz vitamin-A-freier Nahrung, Verbacken des Materials mit vitamin-A-freier Nahrung, unter Umständen auch Zwangsfütterung. Die Schwierigkeiten erhöhen sich dann, wenn das zu prüfende Material vitamin-A-arm ist und in verhältnismäßig großer Menge gereicht werden muß. Dann empfiehlt es sich, das betreffende Material als Prozentanteil der vitamin-A-freien Kost von vornherein beizumischen und mit dieser zu verabreichen. Allerdings ist dann die Aufnahme einer bestimmten Tagesmenge nicht gewährleistet.

Durch die fortgesetzte Wägung der Ratten wird das weitere Verhalten des Körpergewichts kurvenmäßig ermittelt. Nehmen die Tiere trotz der Zugabe

<sup>1</sup> G. MOURIQUAND, J. ROLLET et CHAIX: Bull. Histol. appl. 1931, 8, 72.

nicht zu und verschwindet die Xerophthalmie nicht, so war die Vitamin-A-Zulage zu gering. Bei ganz ungenügendem Gehalt sinkt das Gewicht weiter, die Augenerscheinungen verschlimmern sich und die Ratten sterben schließlich. Die Sektion zeigt, ob Vitamin-A-Mangel bestanden hat oder etwa andere Ursachen für den Tod vorliegen.

Bei ausreichender Zufuhr des fehlenden Vitamins beginnen die Ratten sogleich erheblich an Gewicht zuzunehmen und die Mangelerscheinungen verschwinden innerhalb weniger Tage. Als sicheres Zeichen der Anwesenheit von Vitamin A gilt die Heilung der Keratomalacie. Hierbei tritt als nach GUDJONSSON<sup>1</sup> besonders charakteristisch ein Haar-ausfall an den Augenlidern über eine ziemlich breite Zone auf (periokulare Reaktion, vgl. Abb. 20). Waren die Augenerscheinungen stark ausgeprägt, so kommt es bei der Heilung häufig zum Auftreten des Buphthalmus (Abb. 21), der sog. Ochsen-äugigkeit, in selteneren Fällen zur Ausbildung eines Cornealeukoms (Abb. 22), bzw. zum Verlust des ganzen Augapfels.

Eine 35tägige Beobachtung der Wirkung der täglichen Zulage genügt im allgemeinen, um zu einem Schluß zu kommen. Die Zulage über 60 Tage zu verabreichen, erscheint, sofern nicht spezielle Zwecke dies erfordern, als unnötig.

Zum Aufschreiben der Wachstumskurven bedient man sich am besten großer Kartothekkarten, die auf der einen Seite die Millimereinteilung und die nötigsten Versuchsangaben, auf der anderen Seiten Angaben über Herkunft, Alter, Fütterung und schließlich das Versuchsergebnis evtl. mit Sektionsbefund enthalten. Die nach unseren Angaben angefertigte und seit vielen Jahren bewährte Form dieser Tafel ist in Abb. 23 und 24 wiedergegeben (Größe 16 : 20,5 cm).

**Wägung.** Sofern es sich um zahlreiche Tiere handelt, ist die Wägung auf gewöhnlichen Wagen wegen des damit verbundenen Zeitverlustes un-tunlich. Man verwendet infolgedessen Tafelwagen mit Dämpfungseinrichtung, die sich sehr rasch in die Ruhelage einstellen und eine Genauigkeit von etwa 1 g besitzen. Auf diese Wagen (vgl. Abb. 25), die von den Firmen Dresdener Wagenbau G. m. b. H. (Radebeul), Wagenfabrik A. Bizer A.-G. (Balingen, Wttbg.) und anderen hergestellt werden, werden tarierte Aluminiumgefäße gestellt und in diese dann die zu wägenden Ratten nacheinander eingesetzt und gewogen. Eine Person bringt dazu die Ratten einzeln heran, sagt die Nummer und das Gewicht des Tieres an, während eine zweite



Abb. 21. Buphthalmus. [Nach GUDJONSSON: Acta ophthalm. (Københ.) 1932, 8.]



Abb. 22. Cornealeukom. [Nach GUDJONSSON: Acta ophthalm. (Københ.) 1932, 8.]

<sup>1</sup> S. V. GUDJONSSON: Xerophthalmia in rats and „periocular reaction“. Acta ophthalm. 1930, 8, 184.

Person die Eintragungen auf der Kurventafel bewirkt. Auf diese Weise können mehrere Hundert Ratten in verhältnismäßig kurzer Zeit durchgewogen werden.

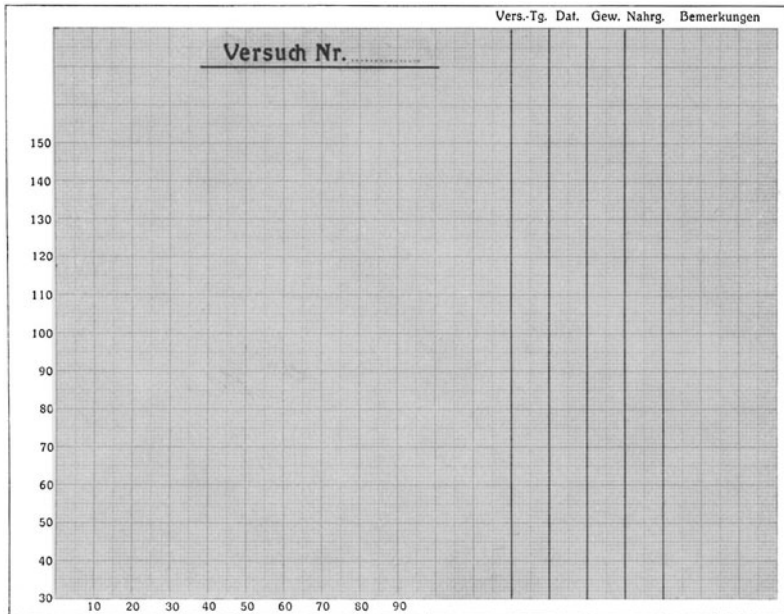


Abb. 23. Kurventafel, Vorderseite.

| No.         |         | Farbe:      |  | Geschlecht:            |         |             |
|-------------|---------|-------------|--|------------------------|---------|-------------|
| Geboren am: |         | Eltern:     |  | Wurf:                  |         |             |
| Datum       | Nahrung | Bemerkungen |  | Datum                  | Nahrung | Bemerkungen |
|             |         |             |  |                        |         |             |
|             |         |             |  | <b>Sektionsbefund:</b> |         |             |
|             |         |             |  |                        |         |             |

Abb. 24. Kurventafel, Rückseite.

**Quantitative Bestimmung.** a) Methode nach SHERMAN (S. 253; siehe oben S. 1478). Es werden dazu Gruppen von 10 und mehr Tieren für jede zu prüfende

Dosis des zu untersuchenden Präparates verwendet. Die Tiere sind sog. standardisierte Tiere, d. h. sie stammen aus einer Zucht, die nach der Methode von SHERMAN gefüttert worden ist (vgl. S. 1478). Bei vitamin-A-freier Diät wachsen die Tiere noch 4–5 Wochen weiter und zeigen eine Gewichtszunahme von 35–50 g. Einzeltiere oder Würfe, die ein zu geringes oder zu starkes Wachstum zeigen und somit vom allgemeinen Durchschnitt abweichen, werden ausgeschaltet. Sobald das Wachstum stockt und sich sonstige Zeichen des Vitamin-A-Mangels deutlich bemerkbar machen, ist die die Vitamin-A-Verarmung herbeiführende erste Periode abgeschlossen. Die Tiere sollen dann ein Gewicht von mindestens 70–75 g und höchstens 100 g besitzen. Gleichgeschlechtliche Tiere zu verwenden, scheint in manchen Fällen ratsam. Die geeigneten Tiere kommen in Einzelkäfige auf Drahtnetze, um sie am Kotfressen zu verhindern. Wenigstens ein Tier jedes Wurfs erhält keine Zulage, bleibt also bei der vitamin-A-freien Diät als „negative Kontrolle“. Jede der Gruppen erhält eine verschieden große Zulage. Es wird nunmehr die Zulage ermittelt, die eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 3 g je Woche innerhalb einer Versuchsdauer von 5 Wochen bedingt. Längere Ausdehnung des Versuches ist nicht zu empfehlen, da dann größere Schwankungen in der Zunahme bemerkbar werden. Man kann dann eine Berechnung der Wirkung in Einheiten durchführen (vgl. S. 1501).

b) Methode nach SCHEUNERT und SCHIEBLICH<sup>1</sup>. Wir haben verschiedentlich versucht, aus der Steilheit der Wachstumskurven quantitative Beziehungen abzuleiten, kamen aber bei der rechnerischen Auswertung vieler Hunderte solcher Kurven zu der Überzeugung, daß trotz allen Vorsichtsmaßregeln Variationen unvermeidlich sind. Manche Tiere sind wüchsiger oder bessere Futterverwerter als andere usf. Uns erscheint danach eine beliebig gewählte Gewichtszunahme keine voll befriedigende Grundlage für die quantitative Erfassung einer Vitamin-A-Wirkung zu sein. Wir gehen deshalb so vor, daß wir diejenige Menge einer zu untersuchenden Substanz ermitteln, die, täglich an jedes Tier einer 10 vitamin-A-verarmte Ratten umfassenden Gruppe verabreicht, genügt, um 80% dieser Tiere über 35 Tage am Leben zu erhalten und von Keratomalacie zu befreien, bzw. vor nachträglichem Auftreten von Keratomalacie zu bewahren. Es wird dabei so vorgegangen, daß Gruppen zu je 10 Tieren aus gleichmäßiger Zucht in Einzelkäfigen auf vitamin-A-freie Nahrung gesetzt werden. Nach 20–40 Tagen sollen die Vitamin-A-Mangelerscheinungen ausgebildet und damit die Verarmungsperiode beendet sein. Dann erfolgt die Zugabe der zu prüfenden Substanz, die für jede Gruppe verschieden hoch bemessen wird. Nach weiteren 35 Tagen wird diejenige Gruppe ausgewählt, die mindestens 8 Tiere aufweist, die in dieser Zeit nicht gestorben sind und bei denen die vorher bestehende Keratomalacie geheilt, bzw. Keratomalacie nicht noch im Verlaufe aufgetreten ist. Ratten, die innerhalb der ersten Versuchstage sterben, werden nicht gerechnet, sondern durch neue ersetzt. Später gestorbene Tiere und solche, die noch Keratomalacie aufweisen, gelten als negativ. Bei



Abb. 25.

<sup>1</sup> A. SCHEUNERT u. M. SCHIEBLICH: Biochem. Zeitschr. 1933, 263, 444.

der Gruppe mit der nächst niedrigeren Dosis müssen mehr als 2 Tiere gestorben sein oder Keratomalacie aufweisen. In Abb. 26 findet sich ein Kurvenbild eines derartigen Versuches. Es ist nach unseren Erfahrungen nicht nötig, die Tiere auf Drahtnetzen zu halten. Als Getränk wird Leitungswasser verwendet.

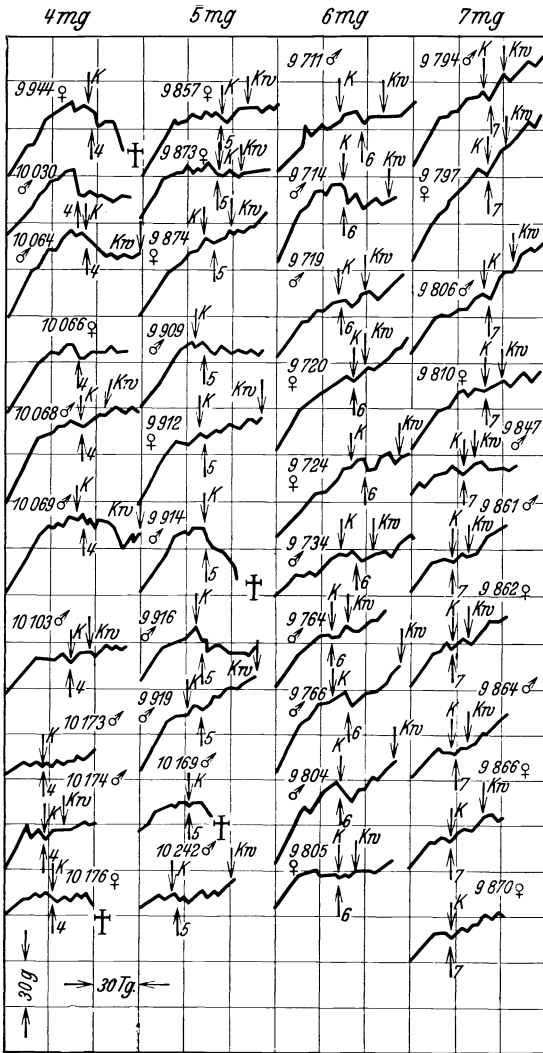


Abb. 26. Bestimmung der nach unserem Vorgehen gerade noch wirksamen Grenzdosis (6 mg) einer Lebertranemulsion. K Keratomalacie; Kru Keratomalacie geheilt.

unregelmäßigen oder durch eine interkurrente Krankheit veränderten Wachstumsverlauf zeigen.

Als Vitamin-A- oder Ratten-Einheit wird diejenige kleinste Tagesdosis angenommen, die unter den geschilderten Versuchsbedingungen eine Gewichtszunahme von mindestens 15 g (3 g je Woche) im Durchschnitt bei 60% der Tiere herbeiführt, sowie das Auftreten von ophthalmischen Erscheinungen verhütet.

**Berechnung in Einheiten.** Die Wirkungsweise wird in Einheiten ausgedrückt, wofür in verschiedenen Ländern und Laboratorien etwas verschiedene Vorschriften gelten, die leider zu einer großen Unklarheit geführt haben.

c) Methode nach MOLL, DALMER, DOBENECK, DOMAGK und LAQUER (S. 1479). Junge, von in bestimmter Weise ernährten Mutterratten (vgl. S. 1478) stammende Ratten im Gewicht von 35–45 g und einem Alter von 4–5 Wochen werden in Einzelkäfigen auf eine vitamin-A-freie Kostform gesetzt. 7 Tage nach dem Einsetzen des Wachstumsstillstandes wird mit der Darreichung des zu prüfenden Präparates begonnen, und zwar werden mindestens 8–10 Tiere für jede Dosis benutzt. Bei starkem Gewichtsabfall wird mit der Verabreichung des Präparates 1–2 Tage früher begonnen. Es kommen nur Ratten zur Verwendung, die zu Beginn der Zulageperiode ein Gewicht von 60–100 g besitzen. Leichtere und schwerere Ratten, sowie solche, die ausgeprägte ophthalmische Erscheinungen zeigen, scheiden aus. Die Verabreichung flüssiger Präparate geschieht in gleicher Weise, wie oben geschildert. Die Dauer der eigentlichen Versuchsperiode beträgt 35 Tage. Bei der Auswertung der Versuche bleiben Ratten, die im Verlauf der ersten 20 Tage zugrunde gehen, unberücksichtigt, ebenso solche, die im Vergleich zu den übrigen der ganzen Gruppe einen auffallend

1. **SHERMANSche Einheiten** (S. 265; siehe oben S. 1478). **SHERMAN** bezeichnet als eine Einheit die Wirkung derjenigen Substanzmenge, die, an eine nach seiner Methode vorbereitete vitamin-A-verarmte Ratte täglich verabreicht, in einer Periode von 4—8 Wochen eine Gewichtszunahme von 3 g je Woche bedingt.

2. **Einheiten der Pharmacopoe der Vereinigten Staaten**<sup>1</sup>. Diese 1926 definierten Einheiten sind zur Bewertung von Lebertran bestimmt. Eine Einheit enthält diejenige kleinste tägliche Menge eines Lebertrans, die erforderlich ist, um die bei jungen Ratten durch Mangel an Vitamin A erzeugten Symptome zu beseitigen und während einer Periode von 35 Tagen eine Gewichtszunahme von 10—20 g zu bewirken.

3. **Dänische Einheiten**. Sie sind zur Bewertung der Margarine (Dänisches Margarinegesetz) ausgearbeitet worden. Eine Einheit enthält diejenige Menge einer Margarine, die, an eine vitamin-A-verarmte Ratte täglich gefüttert, gerade genügt, um in einer Periode von 8 Wochen eine Gewichtszunahme von täglich 1 g zu erzielen.

4. **Internationale Einheiten**. Die durch den Völkerbund einberufene Vitaminkonferenz im Juni 1931 ging von dem Gedanken aus, daß biologische Einheiten in der vorerwähnten Art niemals sichere Anhaltspunkte zu geben vermögen, da der individuelle Einfluß des Versuchstieres zu groß ist. Sie legte deshalb zur Definition der Einheit die Wirkung eines nach internationaler Vereinbarung vom National Institute for Medical Research in London dargestellten, weitgehend gereinigten Carotinpräparates zugrunde. Die Wirkung von  $1 \gamma = 0,001$  mg dieses Carotinpräparates entspricht einer internationalen Einheit. 3—5  $\gamma$  genügen, täglich an eine junge Ratte verabreicht, die sich im Zustand des Vitamin-A-Mangels befindet, um Wiederanstieg des Gewichtes und Heilung der Xerophthalmie herbeizuführen<sup>2</sup>. Zur Einheitsbestimmung ist es also notwendig, daß man diejenige Menge des Standard-Carotins bestimmt, die dem nach den oben unter Nr. 1—3 beschriebenen Methoden ermittelten Grenzwert entspricht. Hierzu ist es notwendig, das Carotin quantitativ zu lösen, wobei man die Konzentration so wählt, daß den Ratten die täglich zu verabreichenden Dosen in 0,1 ccm der Lösung durch eine geeichte Pipette eingegeben werden. Da das Carotin sehr oxydationsempfindlich ist, sind nur bestimmte Öle als Lösungsmittel zulässig. Empfohlen wird Cocosnußöl. Wir verwenden Sesamöl, das zur Befreiung von Sauerstoff  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde mit sauerstofffreier Kohlensäure oder sauerstofffreiem Stickstoff durchperlt wird. Die Lösungen werden in einem mit Kohlensäure oder Stickstoff gefüllten Exsiccator im Dunkeln und kühl (Eisschrank) aufbewahrt und sind dann bis zur Dauer von etwa  $1\frac{1}{2}$  Jahren haltbar (**SCHUEBERT** und **SCHIEBLICH**<sup>3</sup>).

## 7. Nachweis der Vitamin-A-Wirkung mittels der Kolpokeratosemethode.

Nach neueren Ergebnissen äußert sich der Vitamin-A-Mangel in weitgehender Umwandlung normalen in verhorntes Plattenepithel (vgl. Bd. I, S. 793). Methodisch ist dieser Nachweis noch nicht vollständig durchgearbeitet, wird aber von verschiedenen Autoren als brauchbar angesehen. **KLUSSMANN** und **SIMOLA**<sup>4</sup> benutzten das Auftreten verhornter Epithelschollen in Vaginalabstrichen nach dem Vorgehen von **HOHLWEG** und **DOHRN**<sup>5</sup>. Es wurden dazu kastrierte (zur Ausschaltung des normalen oestrischen Zyklus) Rattenweibchen mit einem Anfangsgewicht von 40—60 g verwendet. Nach der Kastration wurden die Tiere etwa 1 Woche lang normal gefüttert und erhielten dann anschließend die übliche vitamin-A-freie Nahrung. Nach 3 Wochen wurde mit den Abstrichproben begonnen. Diese enthielten zuerst, wie gewöhnlich bei kastrierten Tieren, reichlich Schleim und Leukocyten. Unter Verminderung des Schleimgehaltes

<sup>1</sup> The United States „Pharmacopoeia“, 10. Aufl. 1926.

<sup>2</sup> Deutsch. Ärzte-Ztg. 1931, Nr. 291.

<sup>3</sup> A. SCHUEBERT u. M. SCHIEBLICH: Biochem. Zeitschr. 1933, **263**, 454.

<sup>4</sup> E. KLUSSMANN u. P. E. SIMOLA: Biochem. Zeitschr. 1933, **258**, 194.

<sup>5</sup> HOHLWEG u. DOHRN: Zeitschr. ges. exper. Med. 1930, **71**, 762.

traten allmählich Schollen auf und schließlich trat ein reines Schollenstadium ein, das bis zum Tode anhielt. Neuerdings haben BAUMANN und STEENBOCK<sup>1</sup> das Auftreten der Kolpokeratose an Vaginaausstrichen ausführlich verfolgt und halten diese Methode zur quantitativen Auswertung von Vitamin A für geeignet. Es gelingt in kurzer Zeit, die Wirkung ganz bestimmter Vitamin-A-Dosen einwandfrei zu bestimmen, und es können Tiere verschiedenen Alters und auch ein Tier öfter verwendet werden. Die Reaktion selbst ist nach ihnen durchaus spezifisch, was von der üblichen Wachstumsprobe nicht angenommen werden kann.

MOLL und Mitarbeiter (S. 1479) fanden, daß zwar der Genauigkeitsgrad der Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes von Vitamin-A-Präparaten mit Hilfe des Kolpokeratosetestes gegenüber dem unter Verwendung der Wachstumsprüfung nicht günstiger ist, daß aber der erstere gegenüber dem letzteren den Vorteil hat, in verhältnismäßig kurzer Zeit über den Vitamin-A-Gehalt eines Präparates biologisch Aufschluß zu geben. Bei der Durchführung des Testes ist zu beachten, daß Tiere, die zum ersten Male Kolpokeratose zeigen und behandelt werden, verschieden stark reagieren, während die Reaktion gleichmäßiger verläuft, wenn nach dem Wiederauftreten des 100%igen Schollenstadiums die Zeitdauer bis zur Wiederbehandlung (auf 4—5 Tage) abgegrenzt wird. Ein von MOLL und Mitarbeitern (S. 1479) ausgearbeitetes Koordinatensystem gestattet es, Wirkungszahlen, d. h. einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Stärke und die Dauer der Reaktion nach einmaliger Verabreichung einer wirksamen Vitamin-A-Menge zu gewinnen.

Im Zusammenhang mit dieser Methodik sei noch auf die Befunde von HOHLWEG und FISCHL<sup>2</sup> hingewiesen, nach denen in der Vagina kolpokeratotischer Ratten eine bestimmte Spirochätenart vorkommt. Durch Vitamin-A-Zufuhr werden die Spirochäten mit der Kolpokeratose zum Verschwinden gebracht. Die Spirochäten scheinen eine spezifische Begleiterscheinung des Vitamin-A-Mangels zu sein, da sie weder in der Vagina normaler noch kastrierter Ratten anzutreffen sind. Inwieweit sich diese Beobachtungen für die Methodik der Vitamin-A-Bestimmung nutzbar machen lassen werden, ist zunächst nicht zu überblicken, doch dürften darin immerhin erfolgversprechende Aussichten liegen.

## 8. Toxizität des Vitamins A.

Nach v. DRIGALSKI<sup>3</sup>, MOLL, DOMAGK und LAQUER<sup>4</sup>, MOLL und Mitarbeitern (S. 1479) und COLLAZO und RODRIGUEZ<sup>5</sup> wirken Vitamin-A-Präparate in hoher Konzentration toxisch. Die Prüfung erfolgt an erwachsenen Mäusen, denen die zu prüfende Vitamin-A-Lösung durch eine Schlundsonde in Mengen von 0,2 ccm täglich eingegeben wird. Bei einer 20000 Ratteneinheiten betragenden Dosis nehmen die Tiere an Gewicht ab und gehen unter ähnlichen Erscheinungen wie bei der Vitamin-D-Hypervitaminose (vgl. S. 1514) zugrunde. Bei der histologischen Untersuchung fehlen die für Vitamin-D-Hypervitaminose charakteristischen Verkalkungen, jedoch finden sich in zahlreichen Organen pathologische Verfettungen und Lipoidspeicherungen (KUPFERSche Sternzellen, Endothelien der Nieren, der Lungencapillaren und anderer Organe). Junge wachsende Ratten reagieren auf toxische Dosen mit Wachstumsstillstand, trophischen Hautveränderungen mit haarlosen und seborrhischen Zonen, spastischen Kontrakturen der Extremitäten, Lidödem und besonders regelmäßig mit bilateralem Exophthalmus und generalisierter fibröser Osteodystrophie und dadurch bedingten multiplen Frakturen.

## 9. Antimontrichloridreaktion nach CARR und PRICE<sup>6</sup> als Nachweismittel für Vitamin A.

Bei der Suche nach geeigneten Farbreaktionen, mit Hilfe deren in Lebertran die Vitamin-A-Aktivität nachgewiesen werden könnte, fanden ROSENHEIM

<sup>1</sup> C. A. BAUMANN and H. STEENBOCK: Science (N.Y.) 1932 II, 417.

<sup>2</sup> W. HOHLWEG u. V. FISCHL: Klin. Wschr. 1933 II, 1139.

<sup>3</sup> W. v. DRIGALSKI: Klin. Wschr. 1933 I, 308.

<sup>4</sup> TH. MOLL, G. DOMAGK u. F. LAQUER: Klin. Wschr. 1933 I, 465.

<sup>5</sup> J. A. COLLAZO u. J. S. RODRIGUEZ: Klin. Wschr. 1933 II, 1732 u. 1768.

<sup>6</sup> F. H. CARR u. E. A. PRICE: Biochem. Journ. 1926, 20, 494.

und DRUMMOND<sup>1</sup> 1925 das Arsenrichlorid als geeignet. Sie erhielten dabei eine auffallend blaue Färbung und konnten feststellen, daß deren Intensität mit dem Vitamin-A-Gehalt wechselte. Auch wurde bald gezeigt, daß die Reaktion mit Carotin positiv verläuft, obwohl der aus Vitamin A und der aus seiner Vorstufe Carotin mit diesem Reagens entstehende Körper gewisse Unterschiede, die sich spektroskopisch nachweisen lassen, zeigen. Die jetzt allgemein angewandte Reaktion wurde von CARR und PRICE 1926 beschrieben, die das giftige Arsenrichlorid durch Antimontrichlorid ersetzten. Schon ROSENHEIM und DRUMMOND<sup>1</sup> zeigten, daß die Reaktion zur Anwendung bei Medizinallertran und ähnlichen wenig gefärbten Leberölen geeignet ist. Durch Ultraviolettbestrahlung von Lebertran wird zwar die Vitamin-A-Wirkung vernichtet, wohl aber bleibt die Farbreaktion zu 50—75% ihrer ursprünglichen Stärke erhalten (NORRIS<sup>2</sup>). Das Vitamin dürfte somit bei der Bestrahlung keine so eingreifende strukturelle Umwandlung erfahren, daß die Fähigkeit, mit Antimontrichlorid zu reagieren, verloren ginge (KARRER und WEHRLI<sup>3</sup>). Da auch andere Carotinoide (Xanthophyll, Crocetin u. a.), die nicht Vorstufen des Vitamins A sind, mit dem Reagens Blaufärbung geben, ist die Reaktion nicht spezifisch, sondern beschränkt sich nur auf die genannten Öle. Später wiesen insbesondere COWARD, DYER, MORTON und GADDUM<sup>4</sup> noch weiter darauf hin, daß es sich empfiehlt, die Reaktion mit dem Unverseifbaren anzustellen. Das Ergebnis steht dann besser in Einklang mit der biologischen Prüfung, als es bei der Verwendung des ursprünglichen Öles oder Fettes ist. Im Unverseifbaren besteht eine lineare Beziehung zwischen Blaeinheiten und Konzentration (WISE und HEYL<sup>5</sup>). Die Reaktion ist auch bei reinen Carotinslösungen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Carotin) verwendbar.

**Antimontrichloridlösung.** Antimontrichlorid wird mit Chloroform (wasserfrei) gewaschen und getrocknet. Von diesem Produkt wird eine 30%ige Lösung derart hergestellt, daß 30 g Antimontrichlorid mit wasserfreiem Chloroform auf 100 ccm aufgefüllt werden. Das Reagens wird dunkel und trocken aufbewahrt, zum Gebrauch die klare Flüssigkeit abgossen und zur Verwendung in eine Bürette gegeben.

**Vorbereitung des Öles.** Das zu untersuchende Öl wird ebenfalls in wasserfreiem Chloroform gelöst derart, daß 2 ccm Öl auf 10 ccm mit Chloroform aufgefüllt werden. Diese Lösung wird in eine 1 ccm-Bürette gegeben.

**Reaktion.** 0,2 ccm der Öllösung werden mit 2 ccm der Antimontrichloridlösung versetzt und das Gemisch in ein Colorimetergefäß gegeben und hierauf colorimetriert. Nach der ursprünglichen Vorschrift verwendet man ein Lovibond-Colorimeter (ROSENHEIM und SCHUSTER<sup>6</sup>) und vergleicht die Intensität der blauen Farbe mit der Loviband-Farbskala.

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, ist es unerlässlich, daß ganz genau die gleichen Bedingungen eingehalten werden. Auch ist zu bedenken, daß die Farbe sehr bald Veränderungen erleidet, und zwar von Blau über Gelb nach Rot. STEUDEL und PEISER<sup>7</sup> empfehlen deshalb, die Reaktion oft zu wiederholen und zu zweien zu arbeiten, um schnell den richtigen Farbton beim Vergleich zu treffen. Nur die blaue Farbe ist charakteristisch für Vitamin A. Wichtig ist ferner die Einhaltung ganz gleicher Temperaturen, da eine Erhöhung der Temperatur die Geschwindigkeit der Reaktion beeinflusst. Empfohlen werden 16°. Unterschiede von mehr als 1° bedingen bereits Veränderungen des Ausfalls der Reaktion und somit Korrekturen. Ebenso muß darauf geachtet werden, daß die colorimetrische Bestimmung immer in derselben Zeit nach der Mischung der Reagenzien erfolgt; vorgeschlagen werden 30 Sekunden. Die Reaktion ist demnach außerordentlich empfindlich.

<sup>1</sup> O. ROSENHEIM u. J. C. DRUMMOND: Biochem. Journ. 1925, **19**, 752.

<sup>2</sup> R. J. NORRIS: Bull. Bas. Sci. Res. 1931, **3**, 89.

<sup>3</sup> P. KARRER u. H. WEHRLI: Nova Acta Leopoldina, N. F. 1933, **1**, 205.

<sup>4</sup> K. H. COWARD, F. J. DYER, R. A. MORTON and J. H. GADDUM: Biochem. Journ. 1931, **25**, 1102.

<sup>5</sup> E. C. WISE and F. W. HEYL: Journ. Amer. pharmac. Assoc. 1932, **21**, 1142.

<sup>6</sup> O. ROSENHEIM u. E. SCHUSTER: Biochem. Journ. 1927, **21**, 1329.

<sup>7</sup> H. STEUDEL u. E. PEISER: Zeitschr. physiol. Chem. 1928, **174**, 191.



Die englische Pharmacopoe-Kommission hat genaue für die dortigen Verhältnisse gültige Vorschriften aufgestellt, um vergleichbare Lebertranuntersuchungen durchführen zu können. Diese Kommission rät auch davon ab, nach der Blaureaktion den Vitamingehalt mit Hilfe von Blaeinheiten auszudrücken, da ein Farbgrad einer technisch und willkürlich hergestellten Farbskala nicht als Maßstab für eine biologische Wirksamkeit geeignet erscheint. Steht ein Lovibond-Colorimeter nicht zur Verfügung, so können selbstverständlich auch andere Colorimeter verwendet werden. Es müssen dann entsprechende Vergleichslösungen Verwendung finden. Über eine solche Methodik vgl. BLEYER, SCHLEMMER und MÜLLER-PERCHAM<sup>1</sup> und ORLOW<sup>2</sup>. VAN EEKELEN, EMMERIE und Mitarbeiter<sup>3</sup> empfehlen zur Verbesserung der Methodik das Stufophotometer nach PULFRICH-ZEISS unter Verwendung des Filters S. 61. Über die Durchführung der Antimontrichloridreaktion für die speziellen Zwecke der Wertbestimmung des Vitamin-A-Konzentrates „Vogan“ vgl. MOLL und Mitarbeiter (S. 1479).

Die Reaktion hat eine außerordentlich häufige Bearbeitung hinsichtlich ihrer Fehlerquellen und Verwendbarkeit erfahren. Bezüglich der Sicherheit ihrer Ergebnisse ist sie der biologischen Prüfung keineswegs als ebenbürtig zu erachten. Sie wird im Gegenteil von verschiedenen Autoren als ungeeignet zur Erlangung quantitativer Ergebnisse und zum Ersatz der biologischen Methode angesehen [STEUDEL und PEISER (S. 1503), STEUDEL<sup>4</sup>, COWARD (S. 1503), COWARD, DYER und MORTON<sup>5</sup>, SCHMIDT-NIELSEN<sup>6</sup>].

**Spektroskopische Untersuchung.** Für wissenschaftliche Zwecke hat die spektroskopische Untersuchung der blaugefärbten Lösungen zu weitgehenden Aufschlüssen geführt. Es hat sich gezeigt (GILLAM und MORTON<sup>7</sup>), daß der blauen Farbe kein einheitlicher Körper zugrunde liegt. Sie besitzt bei spektroskopischer Untersuchung 2 Absorptionsbanden, deren Maxima bei 572  $m\mu$  und 606  $m\mu$  liegen. Einige Autoren nehmen an, daß die Bande bei 572  $m\mu$  dem Vitamin-A-Gehalt zuzuschreiben ist, die Bande bei 606  $m\mu$  aber dem Oxydationsprodukt einer anderen im Tran enthaltenen Substanz entspricht (HEILBRON, GILLAM und MORTON<sup>8</sup>). Die Ansichten gehen also noch sehr auseinander, und es ist noch nicht entschieden, welchen der möglichen Stoffe die einzelnen Banden zuzuordnen sind (EVERDINGEN<sup>9</sup>). Auf jeden Fall empfiehlt es sich, mit dem Unverseifbaren zu arbeiten, da dann störende Begleitstoffe und Hemmungskörper entfernt werden.

COWARD und Mitarbeiter<sup>5</sup> (S. 1503) haben den Vitamin-A-Gehalt von Lebertran im Tierversuch biologisch, mit der Blaureaktion chemisch und physikalisch durch Spektrophotometrie der blauen Lösungen vergleichend geprüft, wobei sie den unverseifbaren Anteil berücksichtigten. Sie fanden, daß die Unterschiede zwischen der physikalisch-spektrometrischen Bestimmung und dem biologischen Ergebnis viel größer waren, als die Fehler, die nach allgemeiner Erfahrung bei der biologischen Prüfung vorkommen können. Sie kamen ferner zu der Ansicht, daß die Lovibond-Werte, die man von dem Tran direkt erhalten kann, ebenfalls wenig zuverlässig sind, und halten es deshalb für bedenklich, diese Methode zur Vitamin-A-Bestimmung von Tran zu verwenden. Sie vermag nur einen sehr rohen Anhaltspunkt für den Vitamin-A-Gehalt zu geben.

**Spektroskopische Untersuchung von Fischtran.** Lebertran zeigt bei spektroskopischer Untersuchung des ultravioletten Anteils des Spektrums eine Absorptionsbande bei 328  $m\mu$ , die nach zahlreichen Arbeiten dem Vitamin A zugeschrieben werden muß. Nach den Untersuchungen von COWARD, DYER und MORTON<sup>5</sup> (S. 1503) ist die Intensität dieser Absorption auch zur Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes brauchbar und gibt in guter Übereinstimmung mit der biologischen Untersuchung stehende Werte. Wenn nicht ganz frische Öle zur Verfügung stehen, empfiehlt es sich dann, das Unverseifbare zu verwenden. CHEVALLIER und CHABRE<sup>10</sup> beschreiben ein ähnliches Vorgehen mit besonderer Apparatur und halten diese Methode wegen ihrer Genauigkeit und Schnelligkeit für die beste, sogar der biologischen überlegene Bestimmungsweise.

<sup>1</sup> B. BLEYER, F. SCHLEMMER u. W. MÜLLER-PERCHAM: Arch. Pharm. 1931, **269**, 566.

<sup>2</sup> N. I. ORLOW: Z. 1930, **60**, 254, 267.

<sup>3</sup> M. VAN EEKELEN, A. EMMERIE, H. W. JULIUS and L. K. WOLFF: Proceed. Roy. Acad. Amsterd. 1932, **35**, 1347; Acta brev. neerl. Physiol. etc. 1933, **2**, 155. — A. EMMERIE, H. W. JULIUS u. L. K. WOLFF: Nederl. Tijdschr. Geneeskunde 1933, **605**. — A. EMMERIE: Nature (Lond.) 1933, **1**, 364; Acta brev. neerl. Physiol. 1933, **2**, 156.

<sup>4</sup> H. STEUDEL: Biochem. Zeitschr. 1929, **207**, 437.

<sup>5</sup> K. H. COWARD, F. J. DYER and R. A. MORTON: Biochem. Journ. 1932, **26**, 1593.

<sup>6</sup> SCHMIDT-NIELSEN, SIGNE u. SIGVAL: Det Kgl. Norske Videnskabers Selskab. Forhandling 1928 I, Nr. 29.

<sup>7</sup> A. E. GILLAM u. R. A. MORTON: Biochem. Journ. 1931, **25**, 1346.

<sup>8</sup> I. M. HEILBRON, E. A. GILLAM u. R. M. MORTON: Biochem. Journ. 1931, **25**, 1352.

<sup>9</sup> W. A. G. VAN EVERDINGEN: Proceed. Roy. Acad. Amsterd. 1932, **35**, 1339.

<sup>10</sup> A. CHEVALLIER and P. CHABRE: Biochem. Journ. 1933, **27**, 298.

Andere Farbreaktionen sind mehrfach beschrieben worden (ROSENHEIM und DRUMMOND<sup>1</sup>: Purpurrotfärbung mit Schwefelsäure, FEARON<sup>2</sup>: Rotfärbung mit Pyrogallol und Trichloressigsäure), haben sich aber nicht bewährt. Die Pyrogallolreaktion ist überdies unspezifisch (ROSENHEIM und WEBSTER<sup>3</sup>).

### III. Vitamin D.

Zur Prüfung auf das antirachitische Vitamin D werden junge wachsende Ratten aus einer, wie S. 1471—1480 beschrieben, geleiteten und ernährten Zucht verwendet. Bei der Fütterung ist, wie schon S. 1477—1479 ausgeführt wurde, auf Vitamin-D-Armut der Kost zu achten. Zugaben von Lebertran, Vigantol oder anderen vitamin-D-haltigen Präparaten zur Kost der Muttertiere macht das Gelingen des Versuchs zweifelhaft. Die jungen Tiere speichern Reserven auf, die die Erzeugung einer experimentellen Rachitis in Frage stellen.

Die allgemeine Durchführung der Versuche schließt sich auch an die S. 1485—1488 gegebenen Beschreibungen an. An Besonderheiten, die für den Vitamin-D-Versuch maßgebend sind, ist folgendes zu beachten:

**Käfige.** Es können Käfige jeglicher Art verwendet werden. Da z. B. bei der quantitativen Auswertung nach der Schutzmethode häufig Ratten unter 40 g Gewicht zum Versuch verwendet werden und die Tiere im Verlauf des Versuches nur wenig wachsen, sind auch kleine Käfige geeignet. Wir benutzen Aquariumgläser von den Ausmaßen: 14 cm breit, 19 cm lang und 18 cm hoch. Die Ratten werden zweckmäßigerweise auf weitmaschigen Drahteinsätzen gehalten (die Maschenweite beträgt etwa 1 cm), damit abgesetzter Kot sofort hindurchfällt. Die Höhe der Drahteinsätze beträgt 4 cm. Die Drahteinsätze werden auf den Boden des Käfigs, der zum Aufsaugen des Harns usw. mit einer dünnen Schicht Sägespänen beschickt ist, eingestellt. Trink-, Futtergefäße und Deckel sind die gleichen, wie S. 1487 beschrieben.

**Versuchsraum.** Der Versuchsraum wird, obwohl dies nicht unbedingt notwendig ist, am besten dunkel gehalten, um jede Möglichkeit des Eindringens ultravioletter Strahlen auszuschließen. Im übrigen gelten die S. 1488 beschriebenen Verhältnisse.

#### 1. Fütterung.

a) Rachitogene Diät nach STEENBOCK und BLACK Nr. 2965<sup>4</sup>. Die Kost besteht aus:

|                        |     |                           |    |
|------------------------|-----|---------------------------|----|
| Mais, gelber . . . . . | 76% | Calciumcarbonat . . . . . | 3% |
| Weizenkleber . . . . . | 20% | Natriumchlorid . . . . .  | 1% |

Die Bestandteile sollen fein gemahlen sein und bedürfen keinerlei chemischen Vorbereitung. Damit aber den Tieren Vitamin A zur Verfügung steht, ist gelber Mais, der vitamin-A-haltig ist, zu wählen. Bei anderem Mais, können Störungen durch Vitamin-A-Mangel eintreten. Mit dieser Kost entwickeln junge wachsende Ratten, die keine Vitamin-D-Reserven besitzen, innerhalb 30 Tagen schwere Rachitis.

b) Rachitogene Kost nach MCCOLLUM, SIMMONDS, SHIPLEY und PARK Nr. 3143<sup>5</sup>. Die Kost setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

|                        |     |                           |     |
|------------------------|-----|---------------------------|-----|
| Weizen . . . . .       | 33% | Gelatine . . . . .        | 15% |
| Mais, gelber . . . . . | 33% | Calciumcarbonat . . . . . | 3%  |
| Weizenkleber . . . . . | 15% | Natriumchlorid . . . . .  | 1%  |

<sup>1</sup> O. ROSENHEIM u. J. C. DRUMMOND: Lancet (Lond.) 1920 I, 862.

<sup>2</sup> W. R. FEARON: Biochem. Journ. 1925, 19, 888.

<sup>3</sup> O. ROSENHEIM u. F. A. WEBSTER: Biochem. Journ. 1926, 20, 1342; Lancet (Lond.) 1926 II, 806.

<sup>4</sup> H. STEENBOCK and A. BLACK: Journ. Biol. Chem. 1925, 64, 263.

<sup>5</sup> E. V. MCCOLLUM, N. SIMMONDS, P. G. SHIPLEY and E. A. PARK: Journ. Biol. Chem. 1921, 47, 507.

Es besteht die Möglichkeit, daß sich geringe Spuren von Vitamin D sowohl im Weizenkleber als im Weizen finden (BROUWER und DE RUYTER DE WILDT, S. 1478). Besonders störend kann sich der Vitamin-D-Gehalt des Klebers auswirken. Deshalb wird dieser viermal je 2 Stunden mit heißem Wasser und anschließend einmal 2 Stunden lang mit 96%igem Alkohol (mit Petroläther vergällt) unter Rückfluß extrahiert. Auch ein zu hoher Phosphorgehalt des verwendeten Weizens kann sich störend bemerkbar machen. Deshalb wird eine weiche Weizensorte vorgeschrieben. Der Mais, der aus der gelben Varietät (Vitamin-A-Zufuhr) bestehen muß, kann hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung und seines Gehaltes an Vitamin D ebenfalls gewisse Schwankungen aufweisen (HOLMES und TRIPP<sup>1</sup>), doch machen sich diese nach allgemeinen Erfahrungen kaum bemerkbar.

Das Gemisch kann fein vermahlen oder auch in Kuchenform verabreicht werden. Dazu werden die Bestandteile außer der Gelatine mit Wasser angerührt, in dem Rest des Wassers wird die Gelatine aufgelöst. Die heiße Lösung wird mit dem feuchten Gemisch gründlich vermengt. Insgesamt werden auf 1 kg trockene Bestandteile 975 ccm Wasser verwendet, wovon 375 ccm zum Auflösen der Gelatine dienen. Nach dem Erstarren wird der Kuchen in Würfel von etwa 20—25 g Gewicht zerschnitten. Ein Würfel je Tag und Ratte ist zur Fütterung ausreichend. Junge Ratten von 40—45 g werden innerhalb 14 Tagen bei dieser Kost schwer rachitisch.

## 2. Durchführung des Versuches.

Der Rachitisversuch wird entweder als Schutzversuch (prophylaktische Methode) oder als Heilversuch (kurative Methode) durchgeführt. Dazu werden junge Ratten mit einem der oben beschriebenen rachitogenen Kostsätze gefüttert. Beim Heilversuch erhalten die Tiere, nachdem sie einwandfrei rachitisch geworden sind, unter Beibehaltung der rachitogenen Kost die auf Vitamin D zu untersuchenden Zulagen. Beim Schutzversuch bekommen sie zur rachitogenen Kost diese Zulagen sogleich.

Die experimentelle Erzeugung der Rachitis wird durch ein ungünstiges Verhältnis von Calcium:Phosphor in der Kost bewirkt. Die einseitige Kost ist abnorm reich an Calcium und enthält nur wenig Phosphor. Wird dieses Verhältnis durch Zugabe eines Stoffes, der viel Phosphor enthält, verschoben, so wirkt es nicht mehr rachitogen, d. h. die Tiere werden nicht rachitisch. Zu dem Schluß, daß eine Substanz Vitamin D enthält, ist man also nur berechtigt, wenn sicher feststeht, daß die zur Erlangung dieses Nachweises neben der rachitogenen Diät zu fütternde Menge der Substanz so wenig Phosphor enthält, daß dadurch das rachitogene Verhältnis nicht gestört werden kann. Zur Sicherung ist es in unklaren Fällen notwendig, die Zulage zu veraschen und mit der entsprechenden Aschemenge eine Kontrolle durchzuführen. Noch sicherer ist es, das Vitamin D durch erschöpfende Ätherextraktion auszuziehen. Man kann dann entweder den Ätherextrakt selbst verfüttern oder, wenn man ganz exakt arbeiten will, diesen verseifen und das Unverseifbare, das das Vitamin D enthält, verwenden.

Nach unseren Erfahrungen ist der Schutzversuch sicherer und führt schon bei wesentlich geringeren Dosen als der Heilversuch zu klaren Ergebnissen. Beim Heilversuch ist es vor allem schwierig, allgemeingültige Vorschriften dafür zu finden, was als vollzogene Heilung angesehen werden muß oder nicht. Es besteht sehr leicht die Möglichkeit, daß in verschiedenen

<sup>1</sup> A. D. HOLMES and F. TRIPP: Journ. Biol. Chem. 1932, **97**, IX.

Laboratorien und von verschiedenen Bearbeitern beim Heilversuch verschiedene Heilstadien der Beurteilung einer Heilwirkung zugrunde gelegt werden. Dadurch kommen Unsicherheiten zustande. Beim Schutzversuch hingegen läßt sich einwandfrei feststellen, ob Rachitis auch nur andeutungsweise zur Entwicklung gekommen ist.

a) Schutzversuch.

α) Schutzversuch, qualitativ durchgeführt. 4–5 Ratten werden auf rachitogene Diät gesetzt und erhalten täglich die zu prüfende Zulage. 1 bis 2 Ratten bekommen keine Zulage und dienen als negative Kontrollen. Bei STEENBOCK-BLACK-Diät am 31. Tage, bei McCOLLUM-Diät am 15. Tage werden die Ratten durch Chloroform getötet und von den Hinterextremitäten Röntgenaufnahmen hergestellt. Zur Diagnose dienen die Bilder der Kniegelenke. Geschützte Tiere zeigen bei Betrachtung der Filme, also der Negative, am proximalen Ende der Tibia eine als dünne Linie erscheinende scharf begrenzte Epiphysenfuge. Bei rachitischen Tieren ist je nach dem Grade der Rachitis statt der Linie ein mehr oder weniger breiter Spalt mit unscharfen Rändern zwischen Epi- und Diaphyse zu sehen (vgl. Abb. 27). Es ist bei der Stellung der Röntgendiagnose zu beachten, daß die Betrachtung des Films oder der Platte vor einer Beleuchtungslampe die klarsten Bilder ergibt. Abzüge oder Reproduktionen, wie die in Abb. 27 gegebenen, lassen die Verhältnisse nicht so deutlich in Erscheinung treten. Ist bei den Tieren, die Zulagen erhielten, keine Rachitis vorhanden, bei den Kontrollen aber starke Rachitis ausgeprägt, so ist die Diagnose leicht zu stellen.

β) Schutzversuch, quantitativ durchgeführt. Am besten bewährt hat sich die Methode nach SCHEUNERT und SCHIEBLICH<sup>1</sup>, die auch in zahlreichen anderen Laboratorien ausgeführt und auch in den Fabriklaboratorien der I. G. Farbenindustrie und von E. MERCK verwendet wird. Ausführliche Beschreibungen der dortigen Erfahrungen finden sich bei HOLTZ, LAQUER, KREITMAIR und MOLL<sup>2</sup>. Es werden stets 10 Tiere für jede Dosis des zu prüfenden Materials angesetzt und mit der McCOLLUM-Kost Nr. 3143 gefüttert. Kontrolltiere, am besten von jedem der zu den Versuchen verwandten Würfe, die keinerlei Zulage zu der rachitogenen Diät erhalten, sind unerlässlich. Die zu prüfende Substanz muß quantitativ verabreicht werden. Bei Ölen, Tranen und ähnlichen löslichen Substanzen ist Auflösung in Sesamöl empfehlenswert. Die Konzentration der Lösungen ist so zu wählen, daß die zu prüfenden Dosen immer in 0,1 ccm enthalten sind. Die Aufbewahrung der Lösungen erfolgt kühl und im Dunkeln. Bei Lösung der Substanz in Paraffinöl, wie früher beschrieben wurde, ist die Resorption verzögert und man braucht

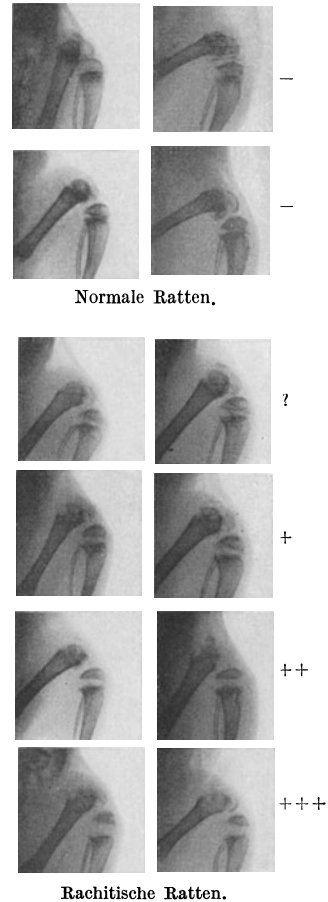


Abb. 27.  
Röntgenbilder der Kniegelenke normaler und rachitischer Ratten.

<sup>1</sup> A. SCHEUNERT u. M. SCHIEBLICH: Biochem. Zeitschr. 1929, 209, 290.

<sup>2</sup> F. HOLTZ, F. LAQUER, H. KREITMAIR u. TH. MOLL: Biochem. Zeitschr. 1931, 237, 247.

etwa die doppelte Menge der Substanz, um die gleiche Wirksamkeit zu erzielen. Die Verabreichung der Lösung erfolgt durch Pipette direkt in das Maul der Tiere. Der Versuch dauert 14 Tage, und es werden 14 Dosen gegeben. Am 15. Tag werden die Tiere getötet und, wie oben beschrieben, Röntgenaufnahmen hergestellt und diagnostiziert. Es wird diejenige täglich je Ratte zu verabreichende Dosis ermittelt, die in der beschriebenen Weise an eine Gruppe von 10 Ratten täglich gegeben, gerade genügt, um mindestens 8 von 10 Ratten vollkommen vor Rachitis zu schützen. Die Wirkung einer solchen Dosis würde dann einer Rattenschutzinheit entsprechen, die wir als SED (Schutzinheit für Vitamin D) bezeichnet haben.

Bei Prüfung von festen Materialien (Futtermitteln u. dgl.) oder voluminösen zähen Extrakten ist es empfehlenswert, diese mit rachitogener Kost zu Kuchen zu verbacken. Die Kuchen dürfen nicht zu groß sein, um quantitative Aufnahme sicherzustellen. Drahtnetze sind dann nicht zu verwenden. Täglich werden die Käfige sorgfältig auf etwa nicht gefressene Kuchenbröckelchen durchgesehen. Sind solche vorhanden, so erhalten die Tiere solange kein Grundfutter, bis sie die Reste aufgefressen haben. Die quantitative Aufnahme ist damit nach Möglichkeit gesichert.

Während des Versuches wird auch das Gewicht der Ratten kontrolliert. Ratten, die während der Versuchszeit weniger als 5 g zugenommen haben, sind auszuschalten, da bei so geringem Wachstum Rachitis oft nicht deutlich zur Entwicklung kommt. Kümmernde und schlecht aussehende Tiere sind deshalb von vornherein ungeeignet und nicht mit anzusetzen. Ferner müssen die Kontrollratten, die keine Zulage erhalten haben, sämtlich deutlich rachitisch geworden sein.

#### b) Verwendung des Aschengehaltes der Knochen zur Rachitisdiagnose.

Von STEENBOCK und seinen Mitarbeitern<sup>1</sup> ist eine Methode ausgearbeitet worden, die den Aschengehalt der Knochen der Hinterextremitäten oder von Humerus und Femur der Ratten zugrunde legt. Dieser schwankt, gleichaltrige Tiere und gleiche Diät vorausgesetzt, nur in engen Grenzen und erniedrigt sich stark bei bestehender Rachitis. Die Knochen werden dazu nach Schluß des Versuches sorgfältig herauspräpariert, die Knie- scheibe und alles anhaftende Gewebe muß entfernt sein. Dann erfolgt Trocknung 2 Tage lang bei 96°. Anschließend werden die Knochen dann nochmals von allen Gewebsresten befreit und nunmehr mit einer Zange zerkleinert (wir haben staubfeine Zerreibung in Mörsern als zweckmäßig befunden). Hierauf erfolgt eine 18stündige Extraktion mit 95%igem Alkohol und dann eine ebensolche mit 2% Alkohol enthaltendem Äther. Nunmehr erfolgt abermalige Trocknung und anschließend Feststellung des Gewichts. Alsdann wird verascht (3 Stunden in einem elektrischen Ofen oder auch in Quarzschalen unter Erhitzung zu Rotglut). Dann wird wieder gewogen und der Aschengehalt berechnet. Extraktion und Veraschung können verschieden gehandhabt werden (CHICK, KORENCEVSKY und ROSCOE<sup>2</sup> und SCHULTZER<sup>3</sup>). Wichtig ist vor allem, daß immer dasselbe Vorgehen eingehalten wird und daß eine sorgfältige Extraktion gewährleistet ist, da verbleibender Fettgehalt die Ergebnisse beeinflusst.

Der Grad der Rachitis kann ausgedrückt werden erstens durch den Aschengehalt der getrockneten extrahierten Knochen (A) oder zweitens durch das Verhältnis A:R, das ist der Aschengehalt zur Menge der fettfreien organischen Substanz der Knochen. Es wird in allen Fällen angezeigt sein, für die in einem Laboratorium übliche Methodik zunächst die maßgebenden Zahlen für vollkommen geschützte, also gesunde Tiere und für schwer rachitische Tiere festzulegen, da die Diät und wohl auch die Abstammung von Einfluß sind (CHICK, KORENCEVSKY und ROSCOE<sup>2</sup>). Wenn auch die Methodik gute Ergebnisse zu zeitigen vermag, so ist sie doch der Röntgen-Methode nach unseren Erfahrungen unterlegen. Insbesondere ist aber zweifellos auch die Schutzmethode der Heilmethode hierbei vorzuziehen (SCHULTZER<sup>3</sup>).

<sup>1</sup> R. M. BETHKE, H. STEENBOCK and M. T. NELSON: Journ. Biol. Chem. 1923/24, 58, 71. H. STEENBOCK and A. BLACK: Journ. Biol. Chem. 1924, 61, 405. — H. STEENBOCK, M. T. NELSON and A. BLACK: Journ. Biol. Chem. 1924/25, 62, 275.

<sup>2</sup> H. CHICK, V. KORENCEVSKY and M. H. ROSCOE: Biochem. Journ. 1926, 20, 622.

<sup>3</sup> P. SCHULTZER: Biochem. Journ. 1931, 25, 1745.

### e) Verwendung des Calcium- und Phosphorspiegels des Blutes bzw. des $p_H$ -Wertes der Faeces zur Rachitisdiagnose.

$\alpha$ ) Sehr viel Arbeit ist auch darauf verwendet worden, mit Hilfe der Bestimmung des Calcium- und Phosphor-Spiegels des Blutes Nachweis- und Bestimmungsmethoden der Rachitis auszuarbeiten. Für die praktische Vitaminarbeit haben diese Methoden keine Bedeutung erlangt, haben dafür aber eine größere Bedeutung für die menschliche Klinik und die Erforschung der entsprechenden Krankheitszustände gewonnen (vgl. Bd. 1, S. 834).

$\beta$ ) BACHARACH und JEPHCOTT<sup>1</sup> haben eine Methode des Vitamin-D-Nachweises auf die Veränderungen des  $p_H$ -Wertes des Faeces der Ratten gegründet. Diese Methode ist von verschiedenen Autoren abgelehnt worden, wird aber von ihren Schöpfern aufrecht erhalten. Eine praktische Bedeutung hat sie nicht gewonnen.

### d) Heilversuch.

$\alpha$ ) Allgemeine Durchführung. Füttert man die rachitogene Diät an junge 50–60 g schwere Ratten über eine Zeit von 3–4 Wochen, so werden sie, vorausgesetzt, daß höchstens geringe Reserven vorhanden sind, in dieser Zeit schwer rachitisch. Es sind dann die Metaphysen der Extremitätenknochen frei von allen Kalkeinlagerungen. Dies zu erzielen ist die Aufgabe der Vorbereitungsperiode der Tiere. Außerlich ist nur wenig an den Tieren zu sehen, zuweilen hat man, wenn sie laufen, den Eindruck, daß die Tiere mit der Hinterhand schwanken. Alsdann beginnt die eigentliche Versuchsperiode, in der nunmehr das auf Vitamin D zu prüfende Material täglich zugelegt wird. Bei den verschiedenen Autoren, die solche Methoden beschrieben haben, zu etwas wechselnden Zeiten, werden die Tiere getötet und nunmehr die Enden der Tibia oder von Radius und Ulna auf das Vorhandensein von Rachitis bzw. Heilungserfolg geprüft.

Nach diesen Prinzipien durchgeführte Methoden krankten an einem schweren Mangel, der darin besteht, daß man nicht weiß, ob die Tiere zu Beginn der eigentlichen Versuchsperiode rachitisch gewesen sind oder nicht. Eine Reihe von Autoren gehen deshalb so vor, daß sie vor Beginn der Versuchsperiode eine Röntgenuntersuchung einschalten. Diese gestattet einwandfrei das Vorhandensein und den Grad der Rachitis zu ermitteln. Sind starke Apparate, die schon klare Aufnahmen bei Belichtungsdauer von  $\frac{1}{10}$  Sekunde ermöglichen, verfügbar, so brauchen die Ratten nicht narkotisiert zu werden. Die Tiere müssen dann in irgendeiner Weise festgehalten werden. Bei weniger wirksamen Apparaten empfiehlt es sich, die Tiere in leichten Ätherrausch (Einsetzen der Ratten in eine Glasbüchse, in der sich ein Wattebausch mit Äther befindet) zu versetzen. Die Ratten sind gegen größere Ätherdosen oft sehr empfindlich, deshalb Vorsicht!

Die Feststellung der Heilung erfolgt am einfachsten wieder durch die Röntgenmethode, die bei Zugrundelegung klarer Bilder über den Grad der Heilung gut unterrichtet. Je nach dem Heilungsgrade ist die bei bestehender Rachitis unverkalkte Metaphysenzonenzone mehr oder weniger vollkommen mit Einlagerungen verkalkten Gewebes angefüllt. Oft erfolgt die Kalkeinlagerung auch in Gestalt eines mehr oder weniger breiten Streifens. Für quantitative Zwecke hat O. SCHULTZ<sup>2</sup> vorgeschlagen, den Spalt der unverkalkten Metaphyse zu messen. Für den Grad der Heilung hat er bestimmte Weitenverhältnisse angegeben (vgl. S. 1512). Eine ausführliche Diskussion über die Diagnose des Heilungsgrades mit der Röntgenmethode haben BOURDILLON, BRUCE, FISCHMANN und WEBSTER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> A. L. BACHARACH. and H. JEPHCOTT: Journ. Biol. Chem. 1929, 82, 751.

<sup>2</sup> O. SCHULTZ: Zeitschr. Kinderheilk. 1929, 47, 449.

<sup>3</sup> R. B. BOURDILLON, H. M. BRUCE, C. FISCHMANN and T. A. WEBSTER: The quantitative estimation of vitamin D by radiography. Med. Res. Council Spec. Rep. Ser. No 158, London 1931.

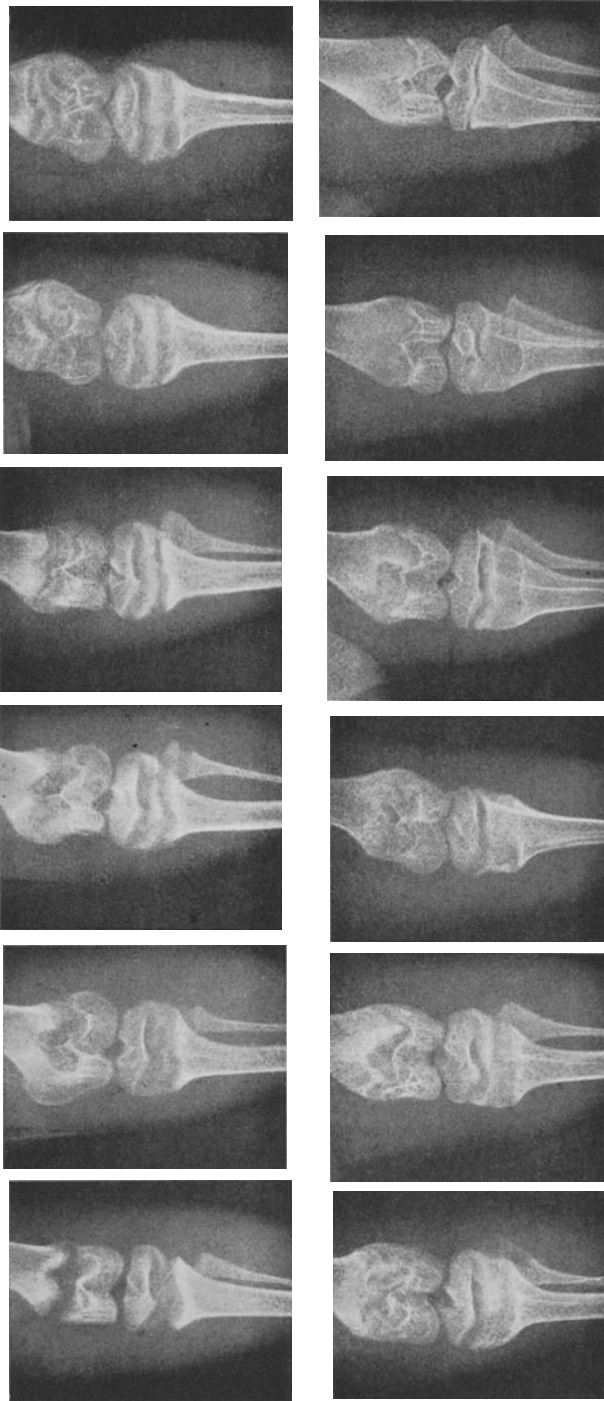


Abb. 28. Heilungsskala der Rattenrachitis nach BOURDILLON, BRUCE, FISCHMAN und WEBSTER.

gegeben. Abb. 28 zeigt die von ihnen aufgestellte Heilungsskala der Rattenrachitis (vgl. hierzu ferner SCHIEBLICH<sup>1</sup>).

Zur Technik der Röntgenkontrolle der Heilung von rachitischen Knochenveränderungen haben VAN NIEKERK und EVERSE<sup>2</sup> einen sehr hübschen und handlichen Apparat konstruiert.

Line-test. Als klassische Methode ist der von McCOLLUM, SIMMONDS, SHIPLEY und PARK<sup>3</sup> erstmalig beschriebene „line-test“ zu bezeichnen. Die Knochen, und zwar am besten die Tibien, ebenso aber auch Ulna und Radius, werden von anhängenden Fleisch- und Sehneteilen befreit und in 4–10 % igen Formaldehyd für etwa 5 Stunden eingelegt. Kann man nicht gleich weiter untersuchen, so können sie mehrere Wochen auf diese Weise aufbewahrt werden. Sie werden dann mit einem scharfen Messer längs durchgeschnitten und 1 bis 2 Minuten in 1–1,5% ige Silbernitratlösung eingebracht. Danach werden sie mit der Schnittfläche nach oben für kurze Zeit dem Sonnenlicht ausgesetzt. Dieses kann vorteilhaft durch ultraviolette Bestrahlung von 10 Sekunden Dauer ersetzt werden. Das entstandene

<sup>1</sup> M. SCHIEBLICH: Biochem. Zeitschr. 1931, **230**, 312. — <sup>2</sup> J. VAN NIEKERK u. J. W. R. EVERSE: Biochem. Zeitschr. 1929, **215**, 85. — <sup>3</sup> E. V. McCOLLUM, N. SIMMONDS, P. G. SHIPLEY and E. A. PARK: Journ. Biol. Chem. 1922, **51**, 41.

Silberphosphat wird dann zu schwarzem kolloidalem Silber reduziert. Auf diese Weise werden die verkalkten Teile der Metaphyse sichtbar gemacht und können nunmehr verglichen werden.

Die Hauptschwierigkeit besteht nun darin, einen bestimmten Heilungsgrad, der bei allen untersuchten Knochen gleich ist, zu ermitteln. In schweren Fällen von Rachitis, wenn die Metaphyse als ein breiter unverkalkter Raum erscheint, tritt bei beginnender Verkalkung zunächst eine sehr schmale schwarze Linie zutage, die die Mitte der Metaphyse durchzieht. Dieser Linie hat die Probe ihren Namen „line-test“ (Linienprobe) gegeben. Bei reichlichen Vitamin-D-Gaben wird diese Linie breiter, streifenförmig und schließlich vermag die Verkalkungszone den Zwischenraum zwischen Epiphyse und Diaphyse bis auf eine schmale Epiphysenlinie total auszufüllen. War die Rachitis zu

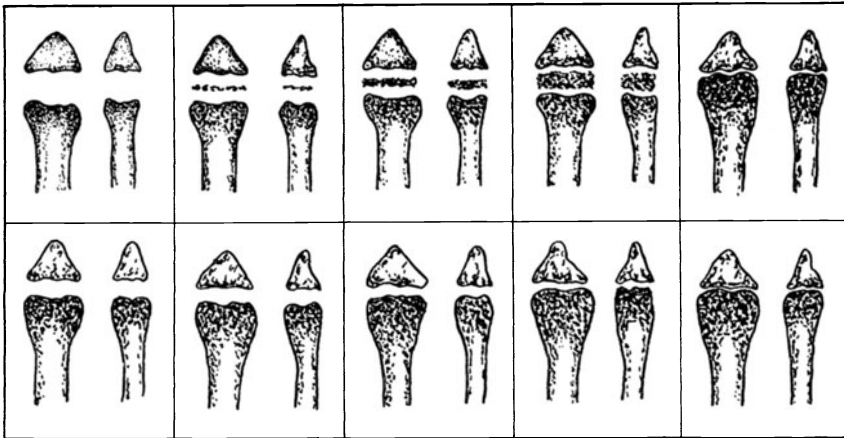


Abb. 29. Schematische Darstellung der Linienprobe nach COWARD.

Beginn des Versuches weniger schwer, so braucht eine Linie nicht aufzutreten, sondern die Verkalkung beginnt dann an der Diaphyse und schreitet mit der Erhöhung der Vitamin-D-Zufuhr epiphysenwärts fort. Es ist in diesen Fällen naturgemäß sehr schwierig zu entscheiden, wieweit die Verknöcherung vor Heilungsbeginn reichte und welcher Zuwachs an verknöchertem Gewebe der Heilwirkung zuzuschreiben ist (Abb. 29). Es wird empfohlen, die Breite der Verkalkungszone als Maßstab für den Grad der Heilung zugrunde zu legen. Dazu ist es notwendig, eine Skala aufzustellen, in die der betreffende Untersucher die mit seiner Handhabung der Methode und auf Grund seiner Erfahrung deutlich unterscheidbaren Heilungsgrade einträgt. Bei Versuchen wird hiermit der Befund jeder Ratte zu vergleichen, einzuordnen und entsprechend zu bezeichnen sein. Bei einer Gruppe von Ratten kann man dann aus den Befunden bei den einzelnen Tieren den Gruppendurchschnitt errechnen. Für quantitative Bestimmungen sind in dieser Beziehung Richtlinien von COWARD<sup>1</sup>, DYER<sup>2</sup>, BILLS, HONEYWELL, WIERICK und NUSSMEIER<sup>3</sup> ausgearbeitet worden.

β) Heilversuch, quantitativ durchgeführt.

1. Methode nach COWARD<sup>1</sup>. Ratten eines Wurfes von 50–60 g Gewicht, die nur geringe Vitamin-D-Reserven besitzen, werden in einem gemeinsamen Käfig 3–4 Wochen mit rachitogener Kost gefüttert. Damit ist die Vorperiode

<sup>1</sup> K. H. COWARD: Quart. Journ. Pharm. 1928, 1, 27; Biochem. Journ. 1933, 27, 451.

<sup>2</sup> F. J. DYER: Quart. Journ. Pharm. 1931, 4, 503.

<sup>3</sup> C. E. BILLS, E. M. HONEYWELL, A. M. WIERICK and M. NUSSMEIER: Journ. Biol. Chem. 1931, 90, 619.



beendet. Hierauf werden sie in Einzelkäfige verbracht und das zu prüfende Material über 10 Tage lang täglich als Zulage verabreicht. Quantitative Aufnahme muß sichergestellt werden. Ferner sind Futterraufnahme und Wachstum zu kontrollieren, da bei nicht wachsenden, hungernden Ratten in kurzer Zeit Spontanheilung eintreten kann. Hierauf erfolgt Prüfung durch line-test und Auswertung wie oben beschrieben. Zur quantitativen Erfassung der Wirkung ist ein Vergleich mit der internationalen Standardlösung für Vitamin D notwendig. Orientierende Vorversuche mit verschiedenen Dosen der zu prüfenden Substanz sind erforderlich, um diejenige Menge davon festzustellen, die der anzuwendenden Dosis des internationalen Standards entspricht. Für ausreichende Kontrolle ist Sorge zu tragen.

2. Methode nach POULSSON und LÖVENSKJOLD<sup>1</sup>. Junge Ratten im Alter von 24 Tagen und im Gewicht von 45–50 g werden auf rachitogene Diät von STEENBOCK und BLACK gesetzt. Nach 2–3 Wochen werden sie zum zweitenmal gewogen und Röntgenaufnahmen der linken Kniegelenke angefertigt (leichte Äthernarkose). Wenn deutliche Rachitis nachgewiesen ist, wird mit der Versuchsperiode begonnen, während der die Ratten in Gruppen zu je 4 zusammen in einem Käfig auf Sägespänen gehalten werden. Hierbei werden, da die Methode speziell für Lebertranuntersuchungen verwendet wird, täglich 5 mg Lebertran zusätzlich verabreicht. Nach genau 10 Tagen erfolgt die dritte Wägung. Nicht genügend gewachsene und kümmernde Tiere werden im Hinblick auf die Möglichkeit spontaner Heilung ausgeschaltet. Am Ende der Versuchsperiode wird abermals eine Röntgenaufnahme gemacht und mit der am Ende der Vorperiode von derselben Ratte hergestellten Aufnahme verglichen.

Beurteilung der Röntgenbilder. Nach der Breite der unverkalkten Metaphysenzone wird die Schwere der Rachitis in 4 Grade eingeteilt. Eine Breite von 4–5 mm entspricht schwerster Rachitis (+++), von 3–4 mm schwerer Rachitis (+++); schmalere Zonen werden mit ++ und + bezeichnet. Es wird gefordert, daß zu Beginn des Versuchs in jeder Gruppe von 4 Ratten mindestens 2 +++ bis ++++ -Rachitis zeigen. Beim Vergleich zu Anfang und zu Ende des Versuchs wird festgestellt, ob sich die Erkrankung gebessert oder verschlechtert hat und danach die Beurteilung des Präparates bewirkt. Auch eine quantitative Auswertung soll möglich sein. POULSSON und LÖVENSKJOLD kommen danach zur Feststellung von biologischen Einheiten und definieren diese derart, daß, wenn 2 mg einer Substanz ein positives Resultat ergeben, diese Substanz in 1 g 500 Vitamin-D-Einheiten enthält.

3. Methode nach O. SCHULTZ (S. 1509). Diese sorgfältig ausgearbeitete Methode beruht auf denselben Grundlagen wie die von POULSSON und LÖVENSKJOLD. Die Ratten werden mit 27 Lebenstagen im Gewicht von 30–50 g eingesetzt und erhalten die McCOLLUM-Diät Nr. 3143. Die Tiere werden unter Lichtabschluß gehalten und in Gruppen zu je 4 verwendet. Die Vorfütterung dauert 14 Tage, worauf eine Röntgenaufnahme der Hinterextremitäten hergestellt wird. Der verkalkte Spalt der Metaphyse wird gemessen ( $v_1$ ). Die Breite soll mindestens 2, höchstens 2,5 mm betragen. Nur solche Tiere sind zum Heilversuch geeignet, der mit abgestuften Dosen ausgeführt wird. Nach weiteren 21 Tagen werden die Tiere getötet und nochmalige Röntgenaufnahmen angefertigt, wovon abermals die Metaphysenspalten der Tibien gemessen werden ( $v_2$ ). Als Differenz  $v_1 - v_2$  wird der Beurteilungstest  $x$  ermittelt. Positiv hat die Menge eines antirachitischen Stoffes gewirkt, wenn für alle 4 oder mindestens 3 Tiere  $x$  größer als 1,8 ist. Zweifelhaft ist die Wirkung, wenn nur bei 2 Tieren  $x$  über 1,8 mm beträgt. Ist bei noch weniger Tieren  $x$  größer als 1,8, so ist die

<sup>1</sup> E. POULSSON u. H. LÖVENSKJOLD: Biochem. Journ. 1928, 22, 135.

Wirkung negativ. Als Definition der antirachitischen Einheit wird angegeben, daß dies die kleinste Menge eines antirachitischen Stoffes ist, die in der Lage ist, innerhalb 21 Tagen die wie oben diagnostizierte ++++-Rachitis in eine - Rachitis zu verwandeln.

Zur Wertbestimmung von Vitamin-D-Präparaten wird die Wirkung in Vitamin-D-Einheiten ausgedrückt. Auch hier sind vielfach biologische, also Ratteneinheiten üblich, wie sie bei den oben unter 1, 2 und 3 beschriebenen Methoden definiert worden sind. Für sie gelten die allgemein auf S. 1501 gemachten Einwände gegen biologische Einheiten aller Art. Die internationale Vitaminkonferenz hat deshalb auch für Vitamin D vorgeschlagen, ein Standardpräparat von stets gleicher Wirkung als Vergleichspräparat zu benutzen. Dieses Präparat wird vom National Institute for Medical Research, London, hergestellt und ist für Deutschland durch das Reichsgesundheitsamt zu beziehen. Diese Standardlösung ist eine in bestimmter Weise ultraviolett bestrahlte 0,1%ige Ergosterinlösung. Eine internationale Einheit für Vitamin D wird durch die Aktivität von 1 mg der internationalen Standardlösung dargestellt (S. 1501). Die Lösung muß dunkel und im Eisschrank oder bei noch tieferen Temperaturen aufbewahrt werden.

### 3. Farbreaktionen.

Auch für das Vitamin D ist, vor allem in der Zeit, als man reines Vitamin D noch nicht kannte, eine Reihe von Farbreaktionen beschrieben worden, deren Spezifität aber durchweg bestritten oder unsicher ist. Sie haben infolgedessen keine Bedeutung zu gewinnen vermocht. Viele von ihnen wurden zudem nicht mit Naturstoffen, sondern mit reinen Lösungen von Ergosterin und bestrahltem Ergosterin vorgenommen.

STOELTZNER<sup>1</sup> beschrieb, daß Vigantolöl (1%ige Lösung von Vitamin D in Olivenöl) mit Phosphorpenoxyd eine rotbraune, allmählich stark nachdunkelnde Färbung ergab. FORSCHNER und HATTINGER<sup>2</sup> fanden sie bei einer Nachprüfung unspezifisch.

SHEAR<sup>3</sup> beschrieb eine Reaktion mit Anilin und konz. Salzsäure, die mit Vitamin D eine deutliche Rotfärbung geben sollte. In der Tat haben ROSENHEIM und WEBSTER<sup>4</sup> sowie SEXTON<sup>5</sup> bestätigt, daß eine solche Farbreaktion mit bestrahltem Ergosterin erhalten wird. Ihre Anwendbarkeit für den Nachweis von Vitamin D in Naturstoffen ist fraglich. Zwei Farbreaktionen, die mit Ergosterin positiv ausfielen, beschrieb ROSENHEIM<sup>6</sup>: 1. mit Chloralhydrat karminrote Lösung, die in 1 Minute in Grün und dann in Dunkelblau umschlägt, 2. Trichloressigsäure in wäßriger Lösung gibt mit einer Ergosterinlösung in Chloroform Rotfärbung. Beide Reaktionen haben einen weiteren Ausbau nicht gefunden. CRUZ-COKE<sup>7</sup> gibt an, daß eine alkoholische Lösung von bestrahltem Ergosterin mit Salzsäure bei 80° eine Fällung gibt, die sich dann wieder unter Grünfärbung auflöst. Weiterer Salzsäurezusatz fällt wieder aus. Es sollen auf diese Weise noch 0,5 mg Ergosterin nachweisbar sein. BLUNT und COWAN<sup>8</sup> geben an, daß bestrahltes Ergosterin mit fuchsin-schwefeliger Säure eine violette Färbung ergibt, unbestrahltes aber nicht. MEESEMAECKER<sup>9</sup> will mit Hilfe von Essigsäureanhydrid und Zinkchlorid in Chloroformlösung unbestrahltes Ergosterin von bestrahltem unterscheiden, ersteres gibt Rot-, letzteres Grünfärbung.

### 4. Spektrographischer Nachweis.

Das Vitamin D hat ein charakteristisches Absorptionsspektrum im ultravioletten Bereich. Besonders bei den Versuchen, reine Präparate vom Vitamin D darzustellen, hat die spektrographische Untersuchung eine große Rolle gespielt und wesentlich zum Erfolg dieser Bestrebungen beigetragen. Sichere und klare Ergebnisse über das Vorkommen von Vitamin D in Naturprodukten dürften mit dieser Methode keineswegs zu erlangen sein,

<sup>1</sup> W. STOELTZNER: Münch. med. Wschr. 1928 II, 1584.

<sup>2</sup> H. FORSCHNER u. A. HATTINGER: Münch. med. Wschr. 1929 I, 156.

<sup>3</sup> M. J. SHEAR: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 1926, 23, 546; vgl. auch V. E. LEVINE, C. LE ROY SEAMAN and E. J. SHAUGHNESSY: Biochem. Journ. 1933, 27, 2047.

<sup>4</sup> O. ROSENHEIM and T. A. WEBSTER: Biochem. Journ. 1926, 20, 537.

<sup>5</sup> W. A. SEXTON: Biochem. Journ. 1928, 22, 1133.

<sup>6</sup> O. ROSENHEIM: Biochem. Journ. 1929, 23, 47.

<sup>7</sup> E. CRUZ-COKE: Compt. rend. Soc. Biol. Paris 1930, 105, 238.

<sup>8</sup> K. BLUNT and R. COWAN: Journ. Amer. med. Assoc. 1929, 93, 1301.

<sup>9</sup> R. MEESEMAECKER: Compt. rend. Acad. Sci. 1930, 190, 216.

während sie bei Verwendung reiner Lösungen, z. B. in Olivenöl, sogar quantitative Auswertungen gestattet. Genaue Angaben über die spektrographische Methode vgl. Bd. II/1, über die Frage des Vitamin-D-Nachweises mit Hilfe dieser Methode bei FUCHS und BECK<sup>1</sup>.

### 5. Toxizität.

Methode von HOLTZ, LAQUER, KREITMAIR und MOLL (S. 1507): Bestrahlte Ergosterinpräparate und auch das reine Vitamin D wirken in sehr großen Dosen toxisch. Deswegen ist zu verlangen, daß zu therapeutischen Zwecken bestimmte Präparate auch auf ihre Toxizität untersucht werden. Die Giftgrenzdosis wird an Mäusen bestimmt, wobei Gruppen von je 4 Mäusen verschieden abgestufte Dosen des zu prüfenden Präparates erhalten. Es wird empfohlen, mindestens 4–5 abgestufte Dosen gleichzeitig zu prüfen. Die Giftgrenzdosis liegt bei den üblichen Bestrahlungsprodukten zwischen der 2000–5000fachen der bei Ratten ermittelten kleinsten antirachitisch wirksamen Dosis. Zu den Versuchen sollen gesunde, ausgewachsene, 16–22 g schwere Tiere Verwendung finden. Die 4 Tiere jeder Gruppe (Weibchen und Böcke trennen, trächtige Weibchen ungeeignet) werden in Mäusegläsern auf Torfstreu gehalten. Die Fütterung erfolgt täglich mit Hafer und feuchtem Brot. Vor Beginn des Versuches werden die Tiere in nüchternem Zustand gewogen.

Die Verabreichung der zu prüfenden Produkte erfolgt in Sesamöllösung, die derartig konzentriert hergestellt wird, daß nicht mehr als 0,2 ccm die zu prüfende Tagesdosis enthalten. Die Verabreichung erfolgt mit der Schlundsonde. Dazu werden elastische Katheter im Durchmesser von 1,4 mm, die in etwa 12 cm lange Stücke zerschnitten werden, verwendet. Die Mäuse werden am Nacken erfaßt, das Maul mit einer Pinzette geöffnet und die Sonde vorsichtig eingeführt. Durch eine mit 0,02 ccm-Einteilung versehene Spritze wird die Tagesdosis appliziert. Sorgfältige Reinigung der Spritzen und Sonden darf nicht vergessen werden. Die Darreichung erfolgt insgesamt zehnmal, wobei am Sonntag mit der Eingabe der Dosis ausgesetzt wird. Somit erhalten die Tiere die letzte Dosis am 11. Tage. Am 12. Versuchstage wird der Versuch abgeschlossen. Toxisch wirkende Dosen beginnen schon nach kürzerer Zeit die Tiere zu beeinflussen. Diese werden traurig, fressen schlecht und zeigen struppiges und von durchfälligen Exkrementen beschmutztes Haarkleid. Alle 2 Tage werden die Tiere gewogen und das Verhalten des Körpergewichtes kontrolliert. Toxische Dosen führen häufig schon nach wenigen Tagen zum Tode. Bei den den 12. Tag überlebenden Tieren wird die Körpergewichtsabnahme ermittelt und hieraus die Durchschnittsabnahme berechnet. Jede Abnahme von über 2,5 g gilt als Giftwirkung.

Bei getöteten Tieren können Verkalkungen, insbesondere der Nieren, mit histologischen Methoden nachgewiesen werden. Die Definition des Giftgrenzwertes wird von HOLTZ, LAQUER, KREITMAIR und MOLL (S. 1507) wie folgt gegeben: „Der Giftgrenzwert des bestrahlten Ergosterins ist diejenige kleinste Tagesmenge pro Tier, die bei mindestens 4 ausgewachsenen weißen Mäusen im Gewicht von über 16 g, in 12 Tagen zehnmal verabreicht, entweder Tiere tötet oder im Durchschnitt eine Gewichtsabnahme von 2,5 g oder mehr herbeiführt, wobei die Mehrzahl der mit höheren Dosen behandelten Mäuse Ablagerung von Kalk in den Nieren haben soll.“

Ferner wird auf Vorschlag dieser Autoren für geprüfte Vitamin-D-Präparate der therapeutische Index ermittelt. Als solcher wird das Verhältnis des an der Ratte festgestellten antirachitischen Grenzwertes zu dem an der Maus bestimmten Giftgrenzwert bezeichnet.

<sup>1</sup> L. FUCHS u. Z. BECK: „Pharmazeutische Presse“, Wissenschaftlich-praktisches Heft Juli, August, September 1933.

## IV. Vitamin E.

Studien mit Vitamin E sind außerordentlich schwierig und beruhen auch heute noch im wesentlichen auf den Arbeiten der Entdecker dieses Vitamins, die in dem zusammenfassenden Werk von EVANS und BURR<sup>1</sup> niedergelegt sind. Es handelt sich dabei methodisch darum, die Versuchstiere, deren Fruchtbarkeit vorher feststehen muß, durch die Fütterung steril zu machen. Nach EVANS und BURR sind hierzu folgende Rationen geeignet:

1. Casein . . . . . 18 %  
 Maisstärke (gekocht und dann getrocknet) . . . . . 54 „  
 Schweinefett . . . . . 19 „  
 Butterfett . . . . . 5 „  
 Salzgemisch nach McCOLLUM und DAVIS Nr. 185 . . . . . 4 „  
 Hierzu Trockenhefe 0,4—0,6 g täglich.
2. Später von den genannten Autoren angegebene Diät:  
 Casein . . . . . 32 %  
 Maisstärke . . . . . 40 „  
 Schweinefett . . . . . 22 „  
 Lebertran . . . . . 2 „  
 Salzgemisch nach McCOLLUM und DAVIS Nr. 185 . . . . . 4 „  
 Hierzu Trockenhefe 0,4—0,6 g täglich.
3. (Zit. nach SHERMAN und SMITH, S. 1478)  
 Casein (vitaminfrei) . . . . . 50 g  
 Saccharose (umkrystallisiert mit 80%igem Alkohol) . . . . . 150 „  
 Salzgemisch nach McCOLLUM und DAVIS Nr. 185 . . . . . 8 „  
 Lebertran: 2—3 Tropfen täglich  
 Trockenhefe: 0,7—1 g täglich  
 Trinkwasser: Destilliertes Wasser mit Spuren von Kaliumjodid

Weibliche Tiere, die mit dieser Ration gefüttert werden, zeigen durchweg normale Brunsterscheinungen, die histologisch durch Vaginalausstriche zu kontrollieren sind. Werden sie bei Eintritt der Brunst von fortpflanzungsfähigen Männchen gedeckt, so werden sie tragend, und es ist im allgemeinen damit zu rechnen, daß sie zunächst noch keine Fortpflanzungsstörungen zeigen, sondern die Jungen austragen, werfen und vielleicht auch teilweise aufziehen. Es empfiehlt sich deshalb, die Vorfütterung länger auszudehnen oder noch besser jugendliche weibliche Tiere mit vitamin-E-freier Kost aufzuziehen. Je nach dem Vorhandensein von Reserven können trotz Beibehaltung der vitamin-E-freien Ration noch 2, ja selbst 3 Würfe erhalten werden. Nach einiger Zeit sind aber die Reserven erschöpft. Trotzdem zeigen die Weibchen noch normale Brunsterscheinungen, also den histologisch kontrollierbaren normalen Ablauf des östrischen Zyklus. Es geht also die Ovulation normal vor sich, und es findet auch beim Belegen eine Befruchtung des Eies statt (Untersuchung auf lebensfähige Spermatozoen im Vaginialschleim). Auch die Einpflanzung des Eies ist normal und das Wachstum der Feten setzt ein. Die Tiere nehmen infolgedessen nach erfolgter Befruchtung ähnlich wie normale Ratten, wenn auch etwas langsamer, an Gewicht zu. Während nun normale Ratten nach etwa 22 Tagen werfen und dann einen starken Gewichtsabfall erleiden, verhalten sich die vitamin-E-verarmten Ratten anders. Etwa am 15. Tag der Trächtigkeit sterben nämlich die Feten ab, und während bei normalen Ratten von diesem Tage an infolge der raschen Entwicklung der Feten die Gewichtszunahme schneller vonstatten geht, findet bei den vitamin-E-frei ernährten Ratten nur noch eine allmähliche und viel geringfügigere Gewichtszunahme statt, die meist am 20. Tage beendet ist. Dann beginnt vom 20. Tage ab eine allmähliche Körpergewichtsabnahme, da die abgestorbenen Embryonen resorbiert werden. Die Ratte wirft

<sup>1</sup> H. M. EVANS and G. O. BURR: The antisterility Vitamine fat soluble E. University of California Press Berkeley, California 1927. Memoirs of the University of California, Bd. 8.

also nicht und zeigt keinen plötzlichen Gewichtsabfall (vgl. Abb. 30). So vorbereitete, vitamin-E-freie Ratten können nunmehr zur Prüfung irgendwelchen Materials auf seinen Gehalt an Vitamin E benutzt werden. Unter Beibehaltung der vitamin-E-freien Diät erfolgt dann eine entsprechende Zulage, und als Erfolg der damit etwa verbundenen Vitamin-E-Zufuhr wird die Ratte, nachdem der nächste Oestrus eingetreten ist, wiederum belegt, tragend, zeigt aber jetzt keine

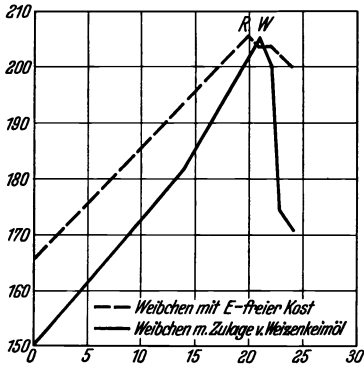


Abb. 30. Durchschnittsgewichtskurven von 107 weiblichen Ratten während der Trächtigkeit bei vitamin-E-freier Kost, die zur Resorption (R) führte, und von 105 auf derselben Kost unter Zugabe von täglich 6 Tropfen Weizenkeimöl gehaltenen Ratten, die Würfe (W) brachten.  
(Nach EVANS und BURR.)

Resorptionssterilität, sondern normalen Verlauf der Trächtigkeit und der Geburt entwicklungs-fähiger Junger.

Die Prüfung an Männchen wird in gleicher Weise einzurichten sein. Zunächst zeigen die Tiere normale Sexualität, und wenn man das nach der Begattung eines Weibchens erhaltliche Ejakulat untersucht, so findet man darin noch reichlich lebensfähige Spermatozoen. Bei Fortdauer der Fütterung verlieren die Spermatozoen ihre Beweglichkeit und verschwinden schließlich ganz aus dem Ejakulat. Später wird solches überhaupt nicht mehr ergossen und schließlich erlischt bei den Männchen jegliches sexuelles Interesse. Heilversuche können bei Männchen nur in den ersten Stadien der Vitamin-E-Verarmung mit Erfolg durchgeführt werden, da die Vitamin-E-Verarmung dauernde Schädigung der Keimepithelien zur Folge hat und dauerndes Unvermögen zur

Spermiogenese bedingt. Bei Arbeiten über dieses Gebiet ist es unerlässlich, die Originalliteratur, die aus Band 1, S. 856f. hervorgeht, eingehend zu studieren, da noch in mancher Richtung, namentlich über die Einheitlichkeit des Vitamins, Unklarheiten bestehen (GRIJNS und DINGEMANSE<sup>1</sup>).

## V. Vitamin B.

Unter Vitamin B versteht man eine Gruppe von zur Zeit etwa 7 wasserlöslichen Vitaminen, die vor allem in der Hefe gleichzeitig vorkommen, und die aber nicht durchweg von allen Tierarten benötigt werden. Am wichtigsten sind davon die Vitamine B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>, die auch eine große Bedeutung für die menschliche Ernährung besitzen und mit gut durchgearbeiteten Methoden ermittelt werden können. Diese sind im folgenden ausführlich dargelegt.

Von den üblichen Versuchstieren benötigen Ratten B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub>, Tauben B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>5</sub>, Kücken vor allem B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>, während von ihnen das hitzelabile Vitamin B<sub>3</sub> entbehrt werden kann. Die noch wenig verwendete Methodik mit Kücken wurde kürzlich von KLINE und Mitarbeitern<sup>2</sup> ausführlich beschrieben.

### 1. Methodik des Rattenversuches.

Allgemeines (auch für Vitamin B<sub>2</sub> gültig): Es werden junge wachsende Ratten im Alter von etwa 4 Wochen und im Gewicht von 50–60 g benutzt. Selbstverständlich können auch jüngere Tiere, wie sie zu den Vitamin-A- und -D-Versuchen gefordert werden, Verwendung finden. Während sich aber für

<sup>1</sup> G. GRIJNS u. E. DINGEMANSE: Koninkl. Akad. van Wetensch. te Amsterdam Proceedings 1933, **36**, 242.

<sup>2</sup> O. L. KLINE, J. A. KEENAN, C. A. ELVEHEJEM and E. B. HART: Journ. Biol. Chem. 1932, **99**, 295.

Vitamin A und D ältere und schwerere Tiere weniger eignen, können solche ohne Schaden, ja mit Vorteil für den B-Versuch benutzt werden. Für das Vitamin B bestehen nennenswerte Speicherungsmöglichkeiten im Tierkörper nicht, so daß bei vitamin-B-freier Nahrung die Verarmung bereits in kurzer Zeit einzutreten pflegt. Es ist deshalb zweckmäßiger, kräftigere Tiere zu B-Versuchen zu verwenden, da leichte und dementsprechend schwächere Tiere oft nach wenigen Tagen durch den Vitamin-B-Mangel in der Nahrung so schwer geschädigt werden, daß starke Körpergewichtsverluste eintreten und der Tod nicht mehr aufzuhalten ist, bzw. die Ratten nicht mehr befriedigend auf eine Vitamin-B-Zulage ansprechen. Man kann deshalb noch Tiere selbst mit Gewichten über 60 g benutzen, wenn dies auch für den späteren Verlauf der Wachstumskurven nicht zu empfehlen ist. Häufig wird es als zweckmäßig empfunden werden, bei umfänglichen Arbeiten über verschiedene Vitamine die in der Zucht anfallenden Tiere zu sortieren und die schwereren dann den B-Versuchen zuzuführen. Eine besondere Fütterung der Zuchtratten ist nicht notwendig. Ankauf junger Ratten ist aber aus den auf S. 1470 dargelegten Gründen nicht zu empfehlen.

Käfige (auch für Vitamin B<sub>2</sub> gültig): Es werden genau dieselben Käfige wie für den Vitamin-A-Versuch benutzt. Die Inneneinrichtung ist nur insofern verschieden, als es bei Arbeiten über Vitamin B unbedingt notwendig ist, das Kotfressen zu verhindern. Da im Kot durch bakterielle Vorgänge im Darm neugebildetes Vitamin B vorhanden sein kann, weiter aber auch bei Vitamin-B-Zulage nicht resorbierte Teile desselben im Kot auftreten können, führt Kotfressen häufig zu Störungen. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die sog. Refection (FRIDERICIA<sup>1</sup>) (vgl. Bd. I, S. 889) besteht. Vitamin-B-verarmte Ratten sind ganz besonders geneigt, der den meisten Nagern eigenen Koprophagie zu huldigen. Deshalb müssen die Ratten auf Drahtböden gehalten werden. Die unserigen aus verzinktem Drahtgeflecht haben eine Höhe von 7 cm und eine Maschenweite von 1 cm, so daß der abgesetzte Kot sofort hindurchfällt und die Höhe des Drahteinsatzes es der Ratte unmöglich macht, mit den Extremitäten die Kotballen wieder zu erlangen (vgl. Abb. 31).

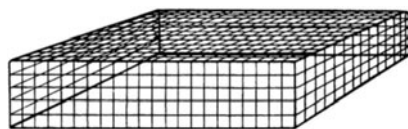


Abb. 31. Drahtboden zur Verhinderung des Kotfressens bei Vitamin-B-Versuchen.

### Vitamin B<sub>1</sub>.

**Vitamin-B<sub>1</sub>-freie Versuchskost.** Die Versuchskost ist aus den gleichen Bestandteilen zusammengesetzt, die auch bei Vitamin-A-Versuchen verwendet werden. Die dort beschriebene Vorbereitung führt auch zu Vitamin-B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Freiheit. Besonders ist darauf zu achten, daß die verwendete Stärke ausreichend mit Wasser ausgewaschen und mit heißem Alkohol extrahiert worden ist, da sonst Vitamin-B-Spuren darin vorhanden sein können. Verwendet man rohe, unvorbereitete Stärke, so wird man mit Fehlschlägen rechnen müssen. Diese bestehen dann darin, daß die Ratten weiter wachsen und man keinen Vitamin-B-Mangel erzielt. Besonders gefährlich ist rohe, unextrahierte Kartoffelstärke, weil diese sehr leicht zu der mit Refektion bezeichneten Erscheinung führen kann.

**Refektion:** Diese besteht in der Neubildung großer Vitamin-B-Mengen im Darmkanal der Tiere durch einen unzüchtbaren vibrioartigen Mikroorganismus (FRIDERICIA<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> L. S. FRIDERICIA: Vortrag XII. Int. Physiol.-Kongr. Stockholm 1926, 3. bis 6. Aug., S. 55; Ber. ges. Physiol. 1927, 38, 526. — L. S. FRIDERICIA, P. FREUDENTHAL, S. GUDJONSSON, G. JOHANNSEN u. N. SCHOUBYE: Journ. Hygiene 1927, 27, 70; Hospitalstidende 1928, 19, 71.

SCHEUNERT, SCHIEBLICH und RODENKIRCHEN<sup>1</sup>, SCHIEBLICH und RODENKIRCHEN<sup>2</sup>). Die Ratten wachsen dann meist außerordentlich rasch und ohne Stockung und bleiben monatelang bei bestem Wohlbefinden. Der Kot solcher Tiere

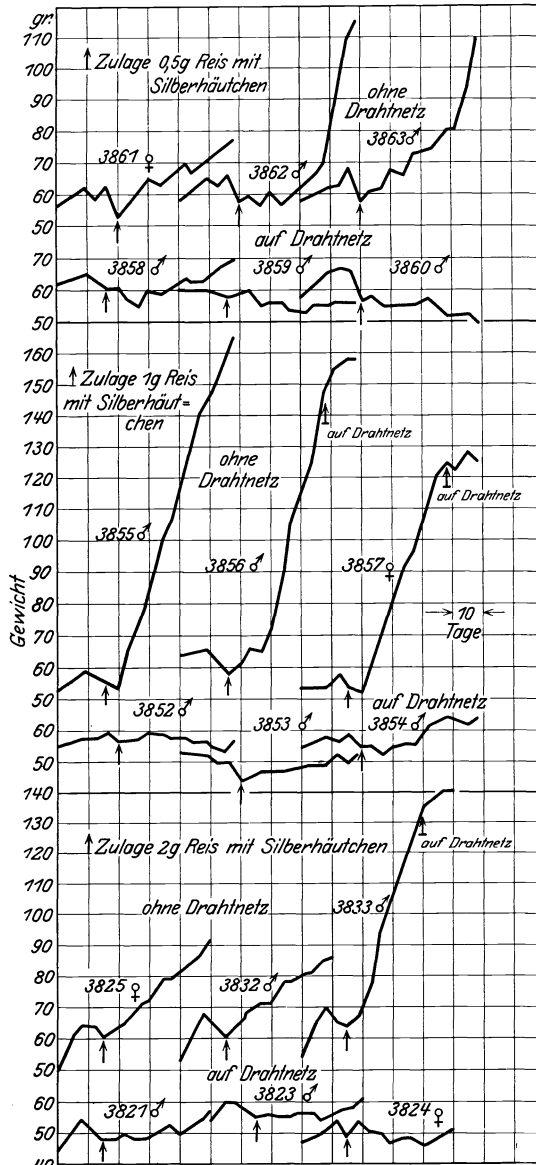


Abb. 32a. Beispiel für das außerordentlich irreführende Auftreten von Refektion bei Haltung der Versuchsratten ohne Drahtnetz im Vitamin-B-Versuch.

beim Eintrocknen direkt weiße Farbe, die auf die Anwesenheit großer Mengen von Stärke zurückzuführen ist. Es empfiehlt sich, wenn bei Versuchen mit vitamin-B-verarmten Ratten unerwarteterweise plötzlich Gewichtsanstiege eintreten, stets an Refektion zu denken. In Abb. 32 a und 32 b geben wir Wachstumskurven eines Rattenversuches wieder, die den störenden und unter Umständen auch sehr irreführenden Einfluß des Auftretens von Refektion deutlich erkennen lassen. Der Nachweis für das Bestehen von Refektion ist wie folgt zu sichern: Von der verdächtigen Ratte wird ein Kotballen gewonnen, hieraus mit steriler Nadel eine Probe entnommen, damit in üblicher Weise ein Ausstrich hergestellt, dieser nach GRAM gefärbt und mit Ölimmersion betrachtet. Bei bestehender Refektion sieht man zahlreiche kommaartige, im allgemeinen gramnegative Mikroorganismen (vgl. Abb. 33). Bei stark ausgeprägter Refektion machen diese bis zu 90% der gesamten im Präparat sichtbaren Flora aus. Solche Ratten sind auszuschalten und die Käfige sorgfältig zu desinfizieren, da Übertragungsfahr besteht (vgl. Abb. 34). Bei Verwendung vorschriftsmäßig extrahierter Stärke ist die Gefahr einer Refektion sehr gering. Sie könnte dann nur durch infizierte Zugaben hervorgerufen werden.

Der Zusammensetzung der vitamin-B<sub>1</sub>-freien Kost liegen die klassischen Beschreibungen und Mengenverhältnisse der amerikanischen Autoren OSBORNE und MENDEL sowie McCOLLUM und Mitarbeiter zugrunde. Die Zufuhr von Vitamin A erfolgt im allgemeinen durch Lebertran oder Butterfett. Da bei der Herstellung der Kost eine feine Vermischung und somit Verteilung auch dieser vitamin-A-haltigen Fette auf eine sehr große Oberfläche be-

wirkt wird, sind Oxydationsmöglichkeiten für das Vitamin A gegeben. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn das als Fettanteil der Kost verwendete Fett ungünstige Eigenschaften hat (vgl. Bd. 1, S. 789). Besonders gefährlich

<sup>1</sup> A. SCHEUNERT, M. SCHIEBLICH u. J. RODENKIRCHEN: Biochem. Zeitschr. 1929, 213, 226.

<sup>2</sup> M. SCHIEBLICH u. J. RODENKIRCHEN: Biochem. Zeitschr. 1929, 213, 234, 245.

ist ranziges Fett. Da bei längerer Aufbewahrung der fertiggestellten Versuchskost namentlich im Sommer auch bei Verwendung anfänglich einwandfreien Fettes leicht Ranzigwerden eintritt und, wie erwähnt, sowieso unter den gegebenen Umständen Oxydationsmöglichkeiten vorhanden sind, ist es unbedingt notwendig, die Kost nur in geringen Mengen, die für nicht mehr als 8 Tage reichen, herzustellen und die Kost auch kühl und dunkel aufzubewahren. Andernfalls kann es vorkommen, daß gleichzeitig Vitamin-A-Mangel besteht, das Wachstum deshalb stockt oder sogar Xerophthalmie auftritt. Aus diesem Grund wird auch der Prozentsatz an Lebertran oder Butterfett verhältnismäßig hoch gewählt. Es sei auch daran erinnert (vgl. Bd. 1, S. 792), daß Eisen-salze die oxydative Zerstörung befördern.

Reines Butterfett wird nach OSBORNE, MENDEL und Mitarbeitern<sup>1</sup> dadurch erhalten, daß Butter in einem in ein Wasserbad getauchtes Gefäß bei Temperaturen von über 45° geschmolzen und anschließend etwa

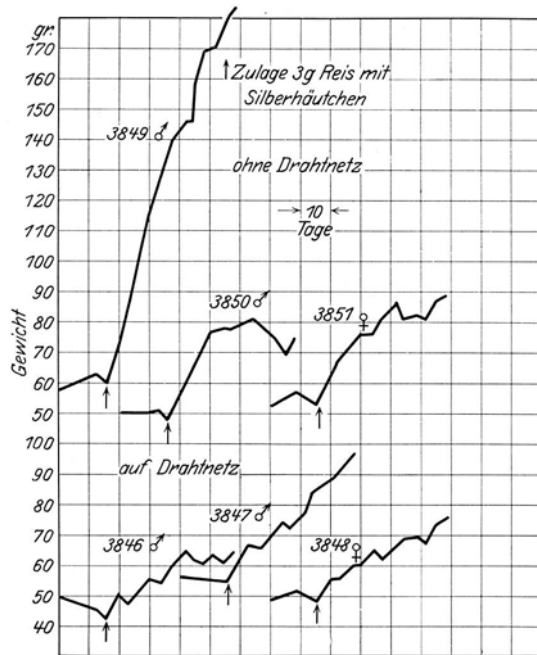
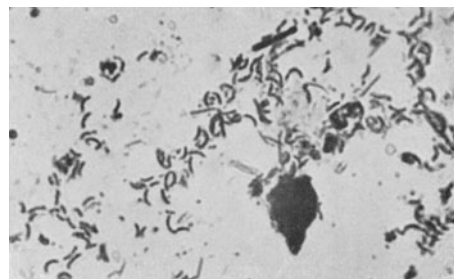
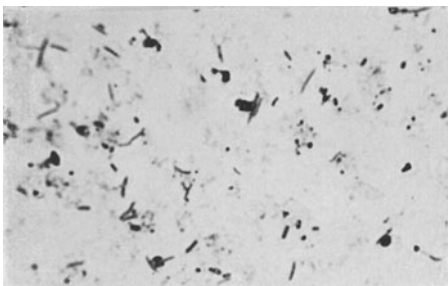


Abb. 32b. Fortsetzung der Abb. 32a.

1 Stunde lang scharf zentrifugiert wird. Durch sorgfältiges Abhebern wird dann das reine klare Fett von den übrigen Butterbestandteilen getrennt.



Ohne Refektion.

Mit Refektion.

Abb. 33. Kotasstrich von Ratten mit vitamin-B-freier Kost.

Besondere Vitamin-D-Zufuhr ist nur dann notwendig, wenn Butterfett, das sehr vitamin-D-arm ist, Verwendung findet. Sie erfolgt dann in gleicher Weise wie auf S. 1491 beschrieben.

Zum Vitamin-B<sub>1</sub>-Nachweis müssen die Tiere Vitamin B<sub>2</sub> erhalten. Dies geschieht am einfachsten nach dem Vorschlag von CHICK und ROSCOE<sup>2</sup> mit

<sup>1</sup> TH. B. OSBORNE, L. B. MENDEL, E. L. FERRY and A. J. WAKEMAN: Journ. Biol. Chem. 1913/14, 16, 423.

<sup>2</sup> H. CHICK and M. ROSCOE: Biochem. Journ. 1929, 23, 498.



Hilfe von energisch autoklavierter Hefe. Hierbei wird das Vitamin B<sub>1</sub>, das relativ hitzeempfindlich ist (Bd. 1, S. 872), zerstört, während das Vitamin B<sub>2</sub> und vermutlich auch die für das Rattenwachstum erforderlichen anderen Vitamine der B-Gruppe erhalten bleiben. SURE<sup>1</sup> hat neuerdings als Vitamin-B<sub>2</sub>-Quelle unter sehr hohem Druck autoklaviertes Pferdefleisch empfohlen. Da es sich ferner unter Umständen nötig machen kann, bestehenden Vitamin-B<sub>4</sub>-Mangel durch Zugabe eines Vitamin-B<sub>4</sub>-Präparates auszugleichen, sei auf die von BARNES und Mitarbeitern<sup>2</sup> beschriebene Herstellungsmethodik eines solchen Präparates verwiesen.

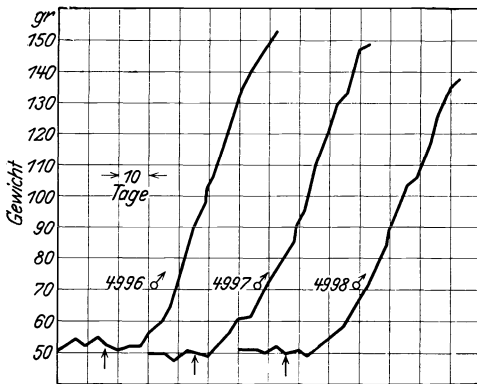


Abb. 34. Die Ratten wurden vitamin-B-frei ernährt. ↑ Zugabe von Kot, der von Ratten stammte, die sich im Zustande der Refektion befanden.

Die fertige Futtermischung wird zur Vermeidung des Auftretens von Refektion gedämpft. Zwecks Zufuhr des Vitamins B<sub>2</sub> werden täglich je Ratte 0,4 g fünf Stunden lang bei 120° im Autoklaven erhitzte Trockenhefe (Bierhefe) gereicht. Die Vitamine A und D werden in Gestalt von 3—5 Tropfen = 0,05—0,1 g Lebertran (je nach der Größe der Ratte) je Tier und Tag zugeführt.

SCHEUNERT und SCHIEBLICH modifizierten diese Kostform mit Erfolg in nachstehender Weise:

|  |       |
|--|-------|
| Casein (mit Wasser und Alkohol extrahiert)               | 168 g |
| Maisstärke (mit Wasser und Alkohol extrahiert)           | 552 „ |
| Palmin   | 70 „  |
| Lebertran  | 80 „  |
| Trockenhefe (Bierhefe) 5 Stunden bei 1 Atm. autoklaviert | 80 „  |
| Salzgemisch nach McCOLLUM und DAVIS                      | 50 „  |

β) E. L. (Eiereiweiß)-Diät:

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| Eiereiweiß (Eiweiß 100, Wasser 700) | 800 g |
| Reisstärke                          | 300 „ |
| Baumwollsaatöl                      | 75 „  |
| Salzgemisch nach McCOLLUM und DAVIS | 25 „  |
| Wasser                              | 50 „  |

Das Eiereiweiß (Vitamin-B<sub>2</sub>-Träger) wird im Wasserbade zur Koagulation gebracht, mit Hilfe eines Wolfes zerkleinert und mit den trockenen Bestandteilen der Kostform vermischt. Der Zusatz des destillierten Wassers erfolgt zum Schluß. Die fertige Futtermischung wird wie die Mischung P<sub>2</sub>L erhitzt; zwecks Zufuhr der Vitamine A und D wird wie bei dieser Lebertran gereicht.

b) Futtermischung nach SHERMAN und SMITH (S. 1478):

|   |      |
|---|------|
| Casein (mit 60%igem Alkohol extrahiert)   | 18%  |
| Stärke                                    | 53 „ |
| Butterfett                                | 8 „  |
| Lebertran                                 | 2 „  |
| Trockenhefe (Bäckereihefe [autoklaviert]) | 15 „ |
| Salzgemisch nach OSBORNE und MENDEL       | 4 „  |

<sup>1</sup> B. SURE: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 1933, **30**, 779.

<sup>2</sup> H. BARNES, J. R. P. O'BRIEN and V. READER: Biochem. Journ. 1932, **26**, 2035.

<sup>3</sup> Siehe Fußnote 2, S. 1519.

Die Trockenhefe wird zwecks Zerstörung des Vitamins  $B_1$  nach Zusatz von 0,1 N.-Natronlauge (125 ccm auf 100 g Trockenhefe) 6 Stunden lang bei  $120^\circ$  im Autoklaven erhitzt und anschließend mit einer standardisierten Salzsäurelösung neutralisiert, getrocknet und gemahlen.

**Durchführung des Versuches.** Die auf der vitamin- $B_1$ -freien Kost gehaltenen jungen Ratten wachsen durchschnittlich noch 14–25 Tage und nehmen dann an Gewicht oft sehr schnell ab. Die gleichzeitig ausgebildeten Mangelerscheinungen bestehen in kümmerlichem Aussehen, Abgemagertsein, Struppigwerden des Felles, blassem Aussehen der unbehaarten Körperteile infolge Anämie. Mit einsetzendem Gewichtsabfall ist täglich zu wiegen und nicht zu lange mit der Zugabe des zu prüfenden Materials zu zögern. Die Zugabe erfolgt dann, wenn man der Überzeugung ist, daß sich das Tier in fortlaufendem Gewichtsabnahmestadium befindet. Es kann vorkommen, daß auch die nervösen Symptome der Polyneuritis auftreten, allerdings nur in sehr seltenen Fällen. Dieses Stadium kommt in der Regel erst nach sehr lange bestehendem Vitamin- $B_1$ -Mangel zur Entwicklung, also dann, wenn die zu prüfende Zulage nicht genügt. Die Erscheinungen sind in Bd. I, S. 877 beschrieben worden. Der positive Ausfall einer Prüfung auf Vitamin  $B_1$  wird bei der vorstehenden Versuchsanordnung durch Wiederaufnahme des Wachstums und allmähliche Wiederherstellung des normalen Aussehens der Tiere gekennzeichnet. Die Aufzeichnung des Versuches erfolgt kurvenmäßig, wie auf S. 1497 für Vitamin A angegeben. Abb. 35 zeigt den typischen Verlauf der Wachstumskurve beim Vitamin- $B_1$ -Versuch.

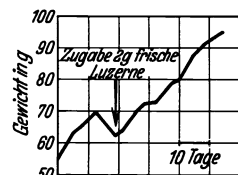


Abb. 35.  
Typische Gewichtskurve von im Vitamin- $B_1$ -Versuch befindlichen Ratten.

Die quantitative Bestimmung schließt sich dem geschilderten Vorgehen an. Die Einrichtung solcher Versuche ist leicht unter sinngemäßer Verwendung der eingehenden Angaben beim Vitamin-A-Versuch auf den Vitamin- $B_1$ -Versuch zu übertragen.

**Einheiten für Vitamin  $B_1$ .** CHICK und ROSCOE (S. 1519) bezeichnen als eine Einheit des Vitamins  $B_1$  diejenige Menge einer Substanz, die bei täglicher Verabreichung an eine junge Ratte im Anschluß an eine Periode vitamin- $B_1$ -freier Fütterung dazu ausreicht, um das Wachstum wieder in Gang zu bringen und eine Gewichtszunahme von etwa 10–14 g je Woche herbeizuführen.

SHERMAN und SMITH (S. 1478) definieren eine Einheit des Vitamins  $B_1$  als diejenige Menge einer Substanz, die bei täglicher Verabreichung an eine gut standardisierte und kontrollierte Ratte nach einer Periode vitamin- $B_1$ -freier Fütterung während einer Versuchsperiode von 4–8 Wochen eine wöchentliche Zunahme von 3 g gewährleistet.

Wir selbst verwenden auch bei Vitamin- $B_1$ -Versuchen Gruppen von je 10 Tieren, die wie beim qualitativen Versuch vorbereitet und dann 35 Tage lang mit verschieden gestaffelten Dosen des zu untersuchenden Materials gefüttert werden. Die Grenzdosis hierbei ist diejenige, die gerade genügt, mindestens 8 von den 10 Ratten einer Gruppe vor dem Tod oder dem Ausbruch der Polyneuritis zu schützen und das Körpergewicht mindestens zu erhalten.

**Internationale Einheiten.** Die Vitamin- $B_1$ -Wirkung einer Substanz wird mit derjenigen eines internationalen Standardpräparates<sup>1</sup> verglichen. Dieses stellt ein Adsorbat des nach der Methode von JANSSEN und DONATH dargestellten, hochgereinigten Vitamins  $B_1$  an Fullers Erde dar. Die Wirkung von 10 mg dieses internationalen Standardadsorptionsproduktes entspricht einer anti-neuritischen Einheit (S. 1501). Es ist dazu ein Vergleichsversuch mit derselben Methode, die für die Auswertung des zu prüfenden Präparates benutzt

<sup>1</sup> Zu beziehen durch das Reichsgesundheitsamt.

worden ist, nötig, um diejenige Menge des internationalen Standardpräparates zu ermitteln, die den gleichen geforderten Wirkungseffekt hervorruft.

Weitere Heilversuchsmethoden: Dazu werden bei Ratten nach 50—80tägiger Fütterung polyneuritische Krämpfe erzeugt. Dann erfolgt die Verabreichung des zu prüfenden Präparates, nach SMITH<sup>1</sup> intravenös, nach KINNERSLEY und PETERS<sup>2</sup> per os. Der Erfolg ist bereits nach sehr kurzer Zeit feststellbar. Auch quantitative Vergleiche sollen möglich sein.

## 2. Methodik des Taubenversuches.

Der Taubenversuch geht bis in die Anfänge der Vitaminforschung zurück und ist somit der klassische Versuch der Vitamin-B<sub>1</sub>-Methodik geworden. Er beruht darauf, daß Tauben, vitamin-B<sub>1</sub>-frei gefüttert, nach einigen Wochen an typischen, polyneuritischen Krämpfen erkranken. Ausführliches hierüber wird in Bd. 1, S. 876 geschildert. Man kann den Versuch dementsprechend entweder als Heilversuch oder als Schutzversuch ausführen. Beide Methoden werden verwendet.

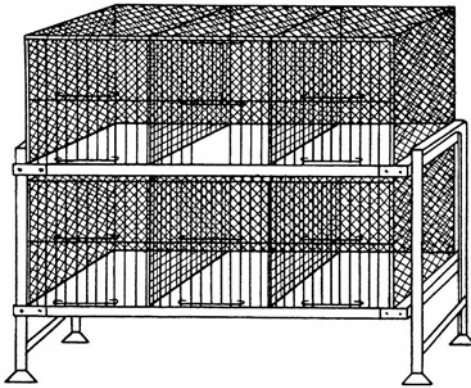


Abb. 36. Versuchskäfig für Tauben.

Statt der Tauben werden auch häufig Hühner und Reisvögel benutzt. Die letzteren kommen für deutsche Verhältnisse nicht in Frage. Die ersteren sind als Versuchstiere teurer zu halten, da sie größere Nahrungsmengen erfordern und auch an sich teurer sind. Vor allem aber haben Hühner andere Vitaminansprüche. Insbesondere muß bei ihnen der Bedarf an den Vitaminen A und D gedeckt werden, während

dieser bei Tauben so gering ist, daß er vernachlässigt werden kann. Hühner werden infolgedessen nur für Spezialuntersuchungen Verwendung finden können, z. B. zum Nachweis von Vitamin B<sub>1</sub> in Grünfutter, da dieses in für den Schutz vor Vitamin-B<sub>1</sub>-Mangel erforderlichen Mengen Tauben nicht beigebracht werden kann (SCHEUNERT und SCHIEBLICH<sup>3</sup>).

**Schutzversuch.** Versuchstiere, Käfige und Versuchsnahrung. Auf Grund unserer Erfahrungen haben wir im Laufe der Jahre das folgende Vorgehen als besonders zweckmäßig erachtet: Die aus dem Schlag entnommenen Tauben sollen sich möglichst im gleichen Gewicht von 250 bis 300 g befinden. Es empfiehlt sich, durchweg graublaue Tauben zu verwenden. Schwarze Tauben sind gegen Vitamin-B<sub>1</sub>-Mangel widerstandsfähiger, weiße und hellgefiederte Tauben hingegen zeigen nach ABDERHALDEN'S Beobachtungen, die wir bestätigen konnten, größere Empfindlichkeit. Als Versuchskäfige können jedwede ausreichend geräumigen Käfige aus Draht, Holz oder auch ausgesprochene Geflügelkäfige dienen. Wir verwenden zusammenklappbare Ausstellungskäfige üblicher Anfertigung (Abb. 36). Die Tauben werden nach dem Verbringen in die Versuchskäfige zur Vorbereitung 8 Tage vorgefüttert, um sie an den Käfig, das Laboratorium und das mit ihnen arbeitende Personal zu gewöhnen und auf die Versuchsnahrung umzustellen. In den ersten Tagen wird noch das gewöhnliche Futter gereicht, dann durch die Versuchskost ersetzt und ihnen täglich zwecks

<sup>1</sup> M. E. SMITH: Publ. Health Rep. Washington 1930, 45, 116.

<sup>2</sup> H. W. KINNERSLEY, R. A. PETERS and V. READER: Biochem. Journ. 1930, 24, 1820.

<sup>3</sup> A. SCHEUNERT u. M. SCHIEBLICH: Zeitschr. Tierzucht u. Züchtungsbiol. 1927, 8, 315; Biochem. Zeitschr. 1927, 186, 222.

Zufuhr von Vitamin B in Form einer Pille 1 g Trockenhefe (mit Wasser angerührt) zwangsweise verabreicht. Bei Beginn des eigentlichen Versuches werden die Tauben gewogen, wozu man sie zweckmäßig in eine große Papiertüte steckt. Gleichzeitig wird die Körpertemperatur gemessen. Dazu werden die Tauben in ein Handtuch eingewickelt und das Fieberthermometer in die Kloake eingeführt. Wenn sich die Quecksilbersäule mehrere Minuten nicht mehr verändert hat, wird die Temperatur abgelesen. Weitere Wägungen und Temperaturmessungen erfolgen dann während des Versuches zweimal wöchentlich, in kritischen Zeiten, d. h. bei zu erwartendem Ausbruch der polyneuritischen Krämpfe jedoch täglich. Nach der ersten Wägung und Messung in den Versuchskäfig zurückgebracht, erhalten die Tauben als alleinige Nahrung 8 Stunden bei 120° in einem Trockenofen erhitzten Reis. Als Trinkwasser dient gewöhnliches Leitungswasser. Der erhitzte Reis, der leicht bräunlich aussieht, ist natürlich keine vollwertige Nahrung. Die Mängel an Vitaminen und Mineralstoffen und vielleicht auch die Eiweißqualität wirken sich aber erfahrungsgemäß während der Dauer des Taubenversuches nicht aus. Will man in dieser Richtung ganz sicher gehen, so empfiehlt es sich, ein vollwertiges Gemisch aus denselben Kostbestandteilen, wie sie zum Rattenversuch verwendet werden, aber ohne Fett, zu benutzen. Dies würde den Tauben allerdings in der Regel zwangsmäßig zu verabreichen sein. Auch bezüglich des Reises ist häufig Zwangsfütterung empfohlen worden. Ob man sie anwendet, ist nach den Versuchszwecken zu entscheiden. Als Beispiele anderer Kostformen seien folgende Kostsätze angegeben:

#### 1. Futtermischung nach SIMONNET<sup>1</sup>:

|  |      |
|--|------|
| Fleischrückstände (mit Alkohol und Äther extrahiert) . . . | 11%  |
| Kartoffelstärke . . . . .                                  | 60,, |
| Erdnußöl (3 Stunden auf 130° erhitzt) . . . . .            | 5,,  |
| Butterfett . . . . .                                       | 10,, |
| Salzgemisch nach OSBORNE und MENDEL . . . . .              | 4,,  |
| Agar, pulverisiert . . . . .                               | 5,,  |
| Cellulose (aschefreies Filtrierpapier) . . . . .           | 5,,  |

Das Gemisch wird unter Zusatz von 80% Wasser zu Pillen geformt und in der Menge von  $\frac{1}{5}$  des Körpergewichtes den Tauben auf zweimal täglich zwangsweise verabreicht.

#### 2. Futtermischung nach LOPEZ-LOMBA und RANDOIN<sup>2</sup>:

|   |      |
|---|------|
| Casein (B-frei) . . . . .                     | 18%  |
| Reisstärke . . . . .                          | 54,, |
| Saccharose . . . . .                          | 4,,  |
| Erdnußöl . . . . .                            | 6,,  |
| Butterfett . . . . .                          | 10,, |
| Salzgemisch nach OSBORNE und MENDEL . . . . . | 4,,  |
| Filtrierpapier, gewöhnliches . . . . .        | 4,,  |

Die Bestandteile werden zu Teig verarbeitet und zu Kuchen gebacken. Zwangsfütterung ist, wenigstens anfänglich, nicht erforderlich.

Bei völlig vitamin-B-freier Kost ist auch an die Vitamin-B<sub>2</sub>- und unter Umständen auch an die B<sub>3</sub>- und B<sub>5</sub>-Zufuhr zu denken, da bei Mangel an diesen Vitaminen das Körpergewicht der Tauben nicht erhalten werden kann. So erfolgt z. B. bei Prüfung reiner Vitamin-B<sub>1</sub>-Präparate die Zufuhr des Vitamins B<sub>2</sub> in Gestalt von Trockenhefe, deren Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt durch Autoklavieren (vgl. S. 1519) zerstört worden ist. Untersucht man Naturstoffe oder Extrakte aus solchen auf ihren Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt, so kann meist eine gesonderte Vitamin-B<sub>2</sub>-Zufuhr entbehrt werden, da die zuzugebenden Stoffe auch die anderen Vitamine mit enthalten.

<sup>1</sup> H. SIMONNET: Compt. rend. Soc. Biol. Paris 1920, 83, 1508.

<sup>2</sup> J. LOPEZ-LOMBA et L. RANDOIN: Compt. rend. Acad. Sci. 1923, 176, 1249.

Durchführung des Versuchs. Der Versuch gestaltet sich nun weiter so, daß die Tauben täglich das zu untersuchende Material in abgewogenen Mengen zwangsmäßig einverleibt erhalten, wobei darauf zu achten ist, daß die Tiere

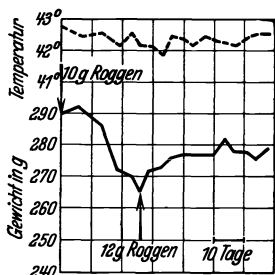


Abb. 37. Typischer Verlauf der Temperatur- und Gewichtskurve bei Bestimmung der Vitamin-B<sub>1</sub>-Grenzdosis einer Substanz im Schutzversuch an Tauben.

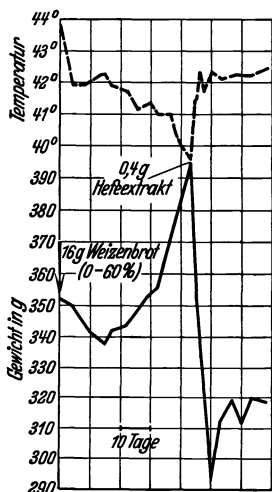


Abb. 38. Anormaler Verlauf der Gewichtskurve (scheinbarer Anstieg) von Tauben im Vitamin-B<sub>1</sub>-Versuch infolge Atonie des Kropfes und des übrigen Verdauungstraktus.

etwa nach einiger Zeit durch Würgebewegungen wieder entleeren. Flüssige Substanzen werden mit Hilfe eines an einer Rekordspritze befestigten dünnen Gummischlauches direkt in den Kropf der Tauben eingebracht (SCHEUNERT und SCHIEBLICH<sup>1</sup>). Für jede zu prüfende Dosis werden 3–4 Tauben verwendet, die in Einzelkäfigen gehalten werden. Ziel der Methode ist es, diejenige Dosis zu finden, bei der die Tauben Körpergewicht und Körpertemperatur über eine ausreichend lange Periode (40–50 Tage) konstant erhalten. Geringe Schwankungen treten dabei auf, und es kann auch ein geringes Steigen des Körpergewichtes stattfinden. Die Körpertemperaturen liegen normalerweise zwischen 41,5 und 43°. Zur Erreichung dieser Grenzdosis kann man so vorgehen, daß man die zu prüfende Zulagemenge entsprechend dem Verhalten der Temperatur- und Gewichtskurven so lange erhöht oder erniedrigt, bis man die Dosis, die gerade Konstanz sichert, gefunden hat. Der Versuch wird durch die beigegebene Abb. 37 demonstriert. Die Tauben reagieren sehr schnell auf kleine Variationen der Zulagemenge.

Bei Prüfung sehr vitamin-B-armer Stoffe, z. B. Brot, muß man sehr große Mengen (10 g und mehr) verabreichen. Infolge des Vitamin-B-Mangels findet dann unter Atonie des Kropfes und des Verdauungstraktus überhaupt keine ordnungsgemäße Entleerung statt, sondern es entsteht eine Anhäufung dieses Materials im Kropf. Diese führt dann zu einem Ansteigen der Gewichtskurve, das meist sehr steil erfolgt. Gleichzeitig fällt dann aber infolge des Vitamin-B<sub>1</sub>-Mangels die Temperaturkurve ab, der Versuch verläuft also trotz des Gewichtsanstieges negativ (vgl. Abb. 38). Will man solche Tauben retten, so gibt man ihnen am besten flüssige vitamin-B<sub>1</sub>-haltige Extrakte.

Der im vorstehenden beschriebene Schutzversuch ist in zahlreichen Arbeiten schon seit Beginn der Vitaminforschung verwendet worden, jedoch wurden dabei entweder die Schutzwirkung gegen das Auftreten der Polyneuritis (EIJKMAN<sup>2</sup>, VEDDER und CLARK<sup>3</sup>, COOPER<sup>4</sup>, CHICK und HUME<sup>5</sup>, JANSEN und DONATH<sup>6</sup>, REYHER<sup>7</sup> u. a.) oder das Erhalten des Gewichtes (WILLIAMS und SEIDELL<sup>8</sup>, SEIDELL<sup>9</sup>) zugrunde gelegt. Das Auftreten polyneuritischer Krämpfe ist nun aber keineswegs regelmäßig und kommt außerdem

<sup>1</sup> A. SCHEUNERT u. M. SCHIEBLICH: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt. Orig. 1922, 88, 290.

<sup>2</sup> C. EIJKMAN: Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. 1897, 1, 268.

<sup>3</sup> E. B. VEDDER u. E. CLARK: Philippine J. Sci. (B) 1912, 7, 423.

<sup>4</sup> E. A. COOPER: Journ. Hygiene 1912, 12, 436; 1914, 14, 12. — Biochem. Journ. 1914, 8, 250.

<sup>5</sup> H. CHICK and E. M. HUME: Proceed. Roy. Soc., London Serie B 1917–19, 90, 44.

<sup>6</sup> B. C. P. JANSEN u. W. F. DONATH: Proc. Kon. Akad. Wetensch., Amsterdam 1926, 29, 1390.

<sup>7</sup> P. REYHER: Zeitschr. Ernährung 1931, 1, 81.

<sup>8</sup> R. R. WILLIAMS and A. SEIDELL: Journ. Biol. Chem. 1916, 26, 431.

<sup>9</sup> A. SEIDELL: Publ. Health Rep. Washington 1922, 37, 801.

bei verschiedenen Tieren zu oft ganz verschiedenen Zeiten vor. Gegen die alleinige Bewertung der Gewichtskonstanz ist einzuwenden (PETERS<sup>1</sup>), daß außer Vitamin B<sub>1</sub> noch andere Vitamine der B-Gruppe zur Erhaltung der Gewichtskonstanz nötig sind.

**Heilversuch.** Der Heilversuch, der schon seit den Anfängen der Vitamin-B-Forschung ausgeführt worden ist, beruht darauf, daß durch Reisfütterung in das Krampfstadium gebrachte Tauben durch Gaben von Vitamin B<sub>1</sub> beinahe plötzlich davon befreit und bald völlig geheilt werden können. Das Krampfstadium ist besonders durch Opisthotonus (Zurückbiegen des Kopfes) charakterisiert. Verschiedene Befunde haben im Laufe der Zeit gezeigt, daß dieser Versuch aber große Irrtumsmöglichkeiten bietet. Vor allem vermögen verschiedene chemische Substanzen, obwohl sie nicht identisch mit Vitamin B<sub>1</sub> sind, das Krampfstadium zu beheben und so Heilung, wenigstens für eine Zeitlang, vorzutäuschen (FUNK<sup>2</sup>, WILLIAMS<sup>3</sup>). Auch andere Irrtumsmöglichkeiten sind bekannt geworden (Verschwinden der Krämpfe durch künstliche Erhöhung der Körpertemperatur, Eingeben von Glucose (PETERS<sup>1</sup>, ROCHE<sup>4</sup>). Auch vorübergehende Spontanheilung (KON und DRUMMOND<sup>5</sup>) kann vorkommen.

Trotzdem ist diese Methode bei sorgfältiger Einhaltung richtiger Bedingungen neuerdings sehr in Aufnahme gekommen. Die Vorschriften knüpfen sich an die Namen von KINNERSLEY, PETERS und READER<sup>6</sup>. Die im Schlag gehaltenen Tauben werden für die Dauer von 20–30 Tagen in einen Freiluftkäfig auf eine Standardkörnerkost gesetzt. Diese besteht aus 1 Teil Buchweizen, 1 Teil Dari, 1 Teil gespaltenem Mais, 1 Teil gespaltenem Weizen und 2 Teilen Weizen. Hierauf kommen die Tauben zum Versuch in Käfige mit Drahtboden und erhalten als Versuchsnahrung polierten Reis. Dieser wird 3 Stunden mit fließendem Wasser unter Umrühren gewaschen. Dann wird das Wasser abgegossen und der Reis unter Erwärmen getrocknet. Hierauf wird er für die Dauer von 2 Stunden bei 120° autoklaviert. Während die Käfige zunächst bei gewöhnlichen Temperaturen gehalten werden, kommen die Versuchstiere, sobald sie Anzeichen beginnender Polyneuritis zeigen, in engere Käfige, die in einem warmen Raum bei 21° stehen. Hierauf bekommen die Tauben 50 mg reiner Glucose in 5 ccm Wasser gelöst und verbleiben 2–3 Stunden in diesem warmen Raum. Diese Maßnahmen sind notwendig, um Irrtümer und Spontanheilungen (s. oben) auszuschließen. Hierauf erfolgt die Zugabe der zu prüfenden Präparate durch eine Sonde in den Kropf. Dann wird der Heilerfolg studiert. Durch Variation der Dosen sind auch quantitative Beurteilungen möglich, da die Geschwindigkeit der Heilung den gegebenen Mengen an Vitamin B<sub>1</sub> proportional ist. Die Methode ist allerdings für Konzentrate und reine Präparate gedacht. Bei ihrer Anwendung für die Auswertung von Nahrungsstoffen treten andere Schwierigkeiten auf, und man muß den Verlauf der Verdauung berücksichtigen. Man verwendet, wenn eine verzögerte Resorption zu befürchten ist, zweckmäßigerweise Extrakte. Quantitative Schlüsse sind dann allerdings nicht mehr möglich, weil Verluste bei der Herstellung dieser Extrakte unvermeidlich sind. Als Vorteile dieser Methode werden besonders die kurze Zeit, die sie erfordert und die benötigten geringen Präparatmengen hervorgehoben. Wichtig ist, daß die Tauben, nachdem die Probe erfolgt ist, wieder durch Hefegaben und warme Haltung in 2–3 Tagen völlig geheilt werden und daß dieselben Tiere dann, nachdem sie wiederum

<sup>1</sup> R. A. PETERS: *Biochem. Journ.* 1924, **18**, 858.

<sup>2</sup> C. FUNK: *Journ. Physiol.* 1912/13, **45**, 489.

<sup>3</sup> R. R. WILLIAMS: *Journ. Biol. Chem.* 1916, **25**, 437.

<sup>4</sup> J. ROCHE: *Compt. rend. Acad. Sci.* 1925, **180**, 467.

<sup>5</sup> S. K. KON and J. C. DRUMMOND: *Biochem. Journ.* 1927, **21**, 632.

<sup>6</sup> H. W. KINNERSLEY, R. A. PETERS and V. A. READER: *Biochem. Journ.* 1928, **22**, 276.

20–30 Tage die eingangs erwähnte Vorfütterung erhalten haben, erneut zu Versuchen benutzt werden können.

Es empfiehlt sich, bei der Auswahl der Versuchstiere diejenigen herauszunehmen, die in kurzer Zeit polyneuritische Krämpfe entwickeln. Man findet immer unter einer Anzahl von Tauben einen erheblichen Prozentsatz solcher Tiere und weiß von ihnen dann ganz genau, innerhalb welcher Zeit sie bei Fütterung mit poliertem Reis Krämpfe bekommen. Diese von den genannten englischen Autoren erhobene Beobachtung ist auch bei uns schon lange bekannt und hat sich für uns als sehr geeignet erwiesen, sicher reagierende Versuchstiere zu gewinnen und mehrmalig auszunutzen.

### Vitamin B<sub>2</sub>.

Bei Mangel an Vitamin B<sub>2</sub> entwickeln sich bei jungen Ratten nach kurzem Stillstand des Wachstums charakteristische, bilateral symmetrische Hautsymptome in Gestalt einer handschuhartigen, scharf abgesetzten, squamösen Dermatitis an den Extremitäten. Ähnliche Veränderungen zeigen sich an

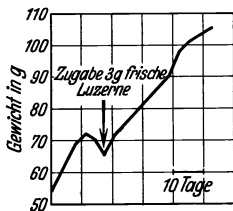


Abb. 39.  
Typische Gewichtskurve von im Vitamin-B<sub>2</sub>-Ver-such befindlichen Ratten.

der Maulspalte, und ebenso treten Augenerscheinungen (Blepharitis) mit Verklebung der Lider ein, die aber nicht mit der Xerophthalmie bei Vitamin-A-Mangel zu verwechseln sind. Auch das Auftreten wachsender, gelbbrauner Hautbeläge ist eine charakteristische Erscheinung des Vitamin-B<sub>2</sub>-Mangels (SMITH<sup>1</sup>). Zum Nachweis dieses Vitamins kann man nur sichere Schlüsse mit Hilfe des Heilversuches ziehen. Allerdings empfiehlt es sich nicht, diesen, wie ebenfalls vorgeschlagen worden ist, auf das Verschwinden der genannten Hautsymptome zu gründen. Die Symptome treten sehr spät auf, so daß oft Todesfälle zu verzeichnen sind. Die Heilwirkung der

vitamin-B<sub>2</sub>-haltigen Präparate ist zwar absolut sicher, aber mengenmäßig auf diese Weise kaum auszuwerten. Wesentlich sicherer ist die Prüfung auf Vitamin B<sub>2</sub> mit Hilfe der Wiederaufnahme des Wachstums durch vorher vitamin-B<sub>2</sub>-verarmte Ratten (Abb. 39). Dabei sei hier daran erinnert, daß man ursprünglich, ehe man Vitamin B<sub>2</sub> von Vitamin B<sub>1</sub> zu unterscheiden vermochte, bereits von einem wachstumsfördernden Faktor des Vitamins B sprach.

Methode des Vitamin-B<sub>2</sub>-Nachweises an Ratten. Käfige, Versuchstiere und Haltung sind dieselben wie für Vitamin B<sub>1</sub> geschildert (S. 1516). Auch die Versuchsnahrung ist bis auf die Vitaminversorgung die gleiche wie oben angegeben. Wir verwenden ähnlich wie ursprünglich OSBORNE und MENDEL:

|   |      |
|---|------|
| Casein . . . . .  | 20 % |
| Maisstärke . . . . .                                    | 60 „ |
| Lebertran . . . . .                                     | 8 „  |
| Salzgemisch (nach McCOLLUM und DAVIS No. 185) . . . . . | 5 „  |
| Palmin . . . . .  | 7 „  |

Hierzu muß nun noch Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>4</sub> gegeben werden. Dazu haben sich bisher, sofern nicht ein hochgereinigtes Vitamin-B<sub>1</sub>-Konzentrat zur Verfügung steht, folgende Futtermischungen und Präparationen am besten bewährt:

|  |       |
|--|-------|
| a) Futtermischung nach CHICK und ROSCOE <sup>2</sup> : |       |
| Casein (hochgereinigt) . . . . .                       | 20 g  |
| Reisstärke . . . . .                                   | 60 „  |
| Baumwollsaatöl . . . . .                               | 15 „  |
| Salzgemisch nach McCOLLUM und DAVIS . . . . .          | 5 „   |
| Wasser . . . . .                                       | 100 „ |

<sup>1</sup> S. G. SMITH: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 1932, **30**, 198.

<sup>2</sup> H. CHICK and M. H. ROSCOE: Biochem. Journ. 1928, **24**, 790.

Die fertige Mischung wird zur Vermeidung von Refektion 3 Stunden lang auf 100° erhitzt. Dazu erhält jede Ratte täglich 0,05—0,1 g Lebertran und 0,1 ccm des antineuritischen Konzentrates von PETERS<sup>1</sup> (S. 1525). Das antineuritische Konzentrat wird erhalten, indem das aus einem wäßrigen Hefeextrakt, der vorher mit Bleiacetat, Quecksilbersulfat und Schwefelwasserstoff behandelt worden ist, gewonnene Holzkohlenkonzentrat mit 50%igem angesäuertem Alkohol extrahiert wird. Dieser Extrakt wird dann bei niederen Temperaturen unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wird von CHICK und ROSCOE in Wasser aufgenommen, derart, daß 0,1 ccm 0,6 g Trockenhefe entsprechen.

b) Futtermischung nach BOURQUIN<sup>2</sup>:

|   |      |
|---|------|
| Casein (gereinigt) . . . . .                  | 18%  |
| Maisstärke . . . . .                          | 68,, |
| Butterfett . . . . .                          | 8,,  |
| Lebertran . . . . .                           | 2,,  |
| Salzgemisch nach OSBORNE und MENDEL . . . . . | 4,,  |

Ein Teil der Stärke trägt das antineuritische Vitamin B<sub>1</sub> in Gestalt des alkoholischen Extraktes aus 50 g ganzem Weizen für je 100 g der Futtermischung. Dieser Extrakt wird folgendermaßen bereitet: 800 g frisch gemahlener Weizen wird mit 1,5 Litern 80%igem Alkohol 1½ Stunden lang geschüttelt. Anschließend wird durch ein Büchnerfilter abgesaugt. Der Rückstand wird erneut mit 80%igem Alkohol versetzt, eine Stunde lang geschüttelt, filtriert und der Rückstand mit 300 ccm Alkohol gewaschen. Die kombinierten Extrakte werden dann im Vakuum 1—1½ Stunden oder so lange eingengt, bis etwa ¼ des ursprünglichen Volumens erreicht ist, auf 300 g Maisstärke gegossen und unter einem elektrischen Ventilator bei Zimmertemperatur getrocknet. Bei der Alkoholzugabe wird der Wassergehalt des Weizens (im Durchschnitt etwa 10%) in Rechnung gesetzt.

Quantitative Messung. Ein internationaler Standard für Vitamin B<sub>2</sub> steht vorläufig noch nicht zur Verfügung, so daß man auf biologische Einheiten angewiesen ist.

BOURQUIN<sup>2</sup> versteht unter einer Einheit des Vitamins B<sub>2</sub> diejenige Menge einer Substanz, die bei täglicher Verabreichung an eine junge Ratte anschließend an eine Periode vitamin-B<sub>2</sub>-freier Fütterung dazu genügt, um eine wöchentliche Gewichtszunahme von etwa 3 g zu unterhalten.

AYKROYD und ROSCOE<sup>3</sup> definieren die Einheit des Vitamins B<sub>2</sub> ähnlich, nur verlangen sie eine wöchentliche Zunahme von 11—14 g.

Zur quantitativen Auswertung muß man sich wieder unter Verwendung von je 10 Ratten je Gruppe dem schon mehrfach beschriebenen Vorgehen (für die Vitamine A und B<sub>1</sub>) anschließen. Unser bei den anderen Vitaminen zugrunde gelegtes Vorgehen der Ermittlung einer Grenzdosis, die Heilung oder Schutz vor Mangelercheinungen und Lebenserhaltung über eine bestimmte Versuchsdauer verlangt, ist hier nicht anwendbar. Bei Vitamin-B<sub>2</sub>-Mangel gehen nämlich die Tiere erst nach sehr langer Zeit zugrunde. Man muß infolgedessen, entsprechend dem Vorgehen von SHERMAN (S. 1478) bei Vitamin A und BOURQUIN<sup>2</sup> bei Vitamin B<sub>2</sub> eine wöchentliche Gewichtszunahme von etwa 3 g oder die von AYKROYD und ROSCOE<sup>3</sup> geforderte wöchentliche Zunahme von 11—14 g zugrunde legen.

#### Andere Vitamine der B-Gruppe.

Bezüglich der anderen Vitamine der B-Gruppe sind sichere Methoden bisher nicht bekannt. Die Untersuchungen befinden sich darüber noch in einem rein wissenschaftlich-theoretischen Stadium, aus dem sich scharf umrissene Methoden noch nicht entwickeln konnten. Es handelt sich hierbei im wesentlichen um Arbeiten mit Hefe bzw. reinen Vitaminpräparaten. Bei Arbeiten über diese Vitamine ist infolgedessen von der Originalliteratur (vgl. Bd. 1, S. 896) auszugehen.

<sup>1</sup> H. W. KINNERSLEY and R. A. PETERS: Biochem. Journ. 1925, 19, 820.

<sup>2</sup> A. BOURQUIN: Diss. Columbia University New York 1929.

<sup>3</sup> W. R. AYKROYD and M. H. ROSCOE: Biochem. Journ. 1929, 23, 483.



## VI. Vitamin C.

Das geeignete Versuchstier ist das Meerschweinchen, über dessen Zucht S. 1481 berichtet worden ist.

1. Käfige. Als Käfige sind jedwede für diese Tierart geeigneten Behälter verwendbar. Bei der Größe der Tiere sind Glasaquarien, wie wir sie der Gepflogenheit unserer Versuchsanordnung entsprechend zunächst benutzen

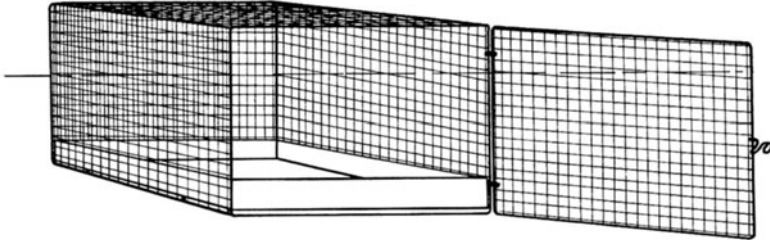


Abb. 40. Versuchskäfig für Meerschweinchen.

(SCHEUNERT und Mitarbeiter<sup>1</sup>), etwas unhandlich und auch kostspieliger. Wir verwenden jetzt einfache rechteckige Käfige aus Drahtgeflecht ohne Boden, wie aus Abb. 40 zu ersehen ist. Eine Schmalseite dieses Käfigs ist als Tür eingebaut. Als Boden wird in die Käfige ein Blecheinsatz eingestellt, der auf zwei die Längsseitenwände verbindenden Metallstangen ruht. Es handelt sich also im Prinzip um eine ähnliche Konstruktion wie bei den auf S. 1486 geschilderten Rattenkäfigen nach OSBORNE und MENDEL. Der Blechuntersatz wird zum Aufsaugen von Harn mit Torfmull beschickt. v. HAHN<sup>2</sup> verwendet statt Torfmull ungebleichten Zellstoff. Die

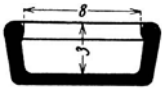


Abb. 41.  
Futternapf für  
Meerschweinchen.

Futternäpfe müssen verhältnismäßig groß und schwer sein (Maße vgl. Abb. 41), damit sie von den Tieren nicht umgeworfen werden können.

Versuchsraum und Aufstellung entsprechen den S. 1488 für Ratten geschilderten Einrichtungen. Nur ist es bei Meerschweinchen nicht notwendig, daß besonders warme Räume benutzt werden.

### 1. Versuchsnahrung.

Die Versuchsnahrung geht auf die Untersuchungen von HOLST und FRÖLICH<sup>3</sup> zurück. Meerschweinchen erkranken, mit Cerealien und Trockenfutter ernährt, an Skorbut. Es ist deshalb vielfach als Skorbutkost lediglich ein Gemisch von Hafer und Kleie oder anderen Cerealien, Brot u. dgl. verwendet worden. Alle solche und ähnliche Nahrungsgemische führen in kurzer Zeit zum Auftreten der genannten Mangelkrankheit, haben aber den großen Nachteil, daß sie außer dem Fehlen des Vitamins C noch andere Mängel aufweisen. Es fehlen ihnen andere Vitamine, das Mineralstoffverhältnis in ihnen ist ungünstig und auch die Eiweißqualität nicht befriedigend. Deshalb können solche Gemische zu Störungen des Versuchsergebnisses führen und sind vor allem für irgendwelche Arbeiten über die Beeinflussung des Stoffwechsels u. dgl. unbrauchbar. Diese Mängel können ausgeglichen werden, etwa durch Zugabe von Heu (alt, gelagert und gut getrocknet, nicht frisch) oder noch besser durch

<sup>1</sup> A. SCHEUNERT, M. SCHIEBLICH u. E. SCHWANEBECK: Biochem. Zeitschr. 1923, **139**, 47.

<sup>2</sup> F.-V. v. HAHN: Z. 1930, **59**, 4.

<sup>3</sup> A. HOLST u. T. FRÖLICH: Journ. Hyg. 1907, **7**, 634; Zeitschr. Hygiene 1912, **72**, 1.

Zugabe von autoklavierter Milch (1 Stunde bei 1 Atm. Überdruck autoklaviert), 60 ccm je Tag (DOLF<sup>1</sup>). Solche Milch ist sicher vitamin-C-frei und bietet gute Ergänzung dar. Allerdings besteht hier noch der Einwand, daß die Mengen, in denen die Milch bzw. das Heu aufgenommen werden, wechseln und somit Mängel dem Ausgleich entgehen können. Deshalb empfiehlt es sich, von vornherein vollwertige Kostformen zusammzusetzen und diese den Tieren zu verabreichen. Solche sind die folgenden: Am meisten bewährt hat sich die Kost des LISTER-Institutes.

a) Futtermischung des LISTER-Institutes (BRACEWELL, HOYLE und ZILVA<sup>2</sup>).

|                            |             |                             |             |
|----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| Kleie . . . . .            | 6 Raumteile | Fischmehl . . . . .         | 1 Raumteil  |
| Gerstenmehl . . . . .      | 2 „         | Hafer, gequetscht . . . . . | 4 Raumteile |
| Weizenfuttermehl . . . . . | 1 „         |                             |             |

Hierzu werden je Tag und Tier 40–60 ccm autoklavierte Milch gegeben, die aus Milchpulver bereitet wird.

MATMON<sup>3</sup> modifizierte diese Futtermischung in folgender Weise:

|                       |      |                    |     |
|-----------------------|------|--------------------|-----|
| Weizenkleie . . . . . | 20%  | Hafer . . . . .    | 49% |
| Gerstenmehl . . . . . | 20 „ | Kochsalz . . . . . | 1 „ |
| Fischmehl . . . . .   | 10 „ |                    |     |

100 g dieses Gemisches werden mit 40–50 ccm wie oben autoklavierter Milch zusammen gemischt.

SCHUNERT ergänzt dieses Gemisch noch durch Zugabe von 0,1% Calciumcarbonat.

b) Futtermischung nach SHERMAN, LA MER und CAMPBELL<sup>4</sup>.

|  |      |
|--|------|
| Hafer, gemahlen . . . . .  | 59%  |
| Magermilchpulver (in offenen Schalen bis zur Zerstörung des Vitamins C bei 110° erhitzt) . . . . . | 30 „ |
| Butterfett, frisch bereitet . . . . .  | 10 „ |
| Kochsalz . . . . .   | 1 „  |

Der Hafer wurde später durch ein Gemisch von gerolltem Hafer 39% und Kleie 20% der Ration ersetzt.

Als Getränk wird Leitungswasser angeboten, sofern nicht autoklavierte Milch gesondert gegeben wird.

Bei Verwendung von keimungsfähigem Hafer oder anderen Cerealien ist es von größter Wichtigkeit, daß die Käfige alle 2–3 Tage vollkommen gereinigt und mit neuer Bettung versehen werden. Die Meerschweinchen streuen Hafer und diese verstreuten Körner vermögen in der durch Harn und vielleicht auch verschüttetes Trinkwasser feuchten Bettung zu keimen. Bei der Quellung und Keimung bildet sich dann Vitamin C (vgl. Bd. 1, S. 935), und es ist eine Selbstverständlichkeit, daß die Tiere dann nicht mehr an Vitamin-C-Mangel erkranken können.

## 2. Durchführung des Versuchs.

Die meisten Autoren bedienen sich des Schutzversuches, der auf HOLST und FRÖLICH (S. 1528) zurückgeht. Große Unterschiede zwischen dem Vorgehen verschiedener Autoren bestehen im allgemeinen nicht. Besonders

<sup>1</sup> E. M. DOLF: Biochem. Journ. 1918, 12, 416.

<sup>2</sup> M. F. BRACEWELL, E. HOYLE and S. S. ZILVA: Med. Res. Council, Spec. Rep. Ser. Nr. 146, S. 45, London 1930.

<sup>3</sup> A. MATMON: Zeitschr. Ernährung 1931, 1, 233.

<sup>4</sup> H. H. SHERMAN, V. K. LA MER and H. L. CAMPBELL: Proc. nat. Acad. Sci. 1921, 7, 279; Journ. Amer. Chem. Soc. 1922, 44, 165.

umfangreiche Erfahrungen besitzen die Autoren des LISTER-Institutes, von denen als gegenwärtig erfahrenster Forscher auf diesem Gebiet ZILVA (S. 1529) vor kurzem sein Vorgehen ausführlich geschildert hat.

**Auswahl und Vorbereitung der Versuchstiere.** In der Regel werden junge Meerschweinchen im Gewicht von 300—350 g in den Versuch genommen. Jedoch werden vielfach auch niedrigere Anfangsgewichte gewählt. Wir haben immer die Erfahrung gemacht, daß solche jungen Tiere sehr wenig widerstandsfähig sind und leicht zugrunde gehen, vor allem aber sehr wenig geneigt sind, die zu prüfenden Stoffe freiwillig aufzunehmen. Es empfiehlt sich, aus der Meerschweinenzucht und auch von angekauften Tieren (vgl. S. 1481) zunächst diejenigen herauszusuchen, die freiwillig die Versuchskost fressen. Andere Tiere sind ungeeignet. Es ist deshalb anzustreben, alle Tiere vor dem Versuch an die Aufnahme der Kost zu gewöhnen. Für diesen Zweck ist es ratsam, den Tieren als Hartfutter lediglich die Versuchskost zu verabreichen und zur Deckung des Vitamin-C-Bedarfes entweder Grünfutter oder Rüben, am besten weiße oder Kohlrüben, anzubieten. Wir haben es sogar manchmal für geboten erachtet, schon die Muttertiere mit den Jungen auf diese Weise zu füttern. Die jungen Meerschweinchen gewöhnen sich dann, durch das Beispiel des Muttertieres angeregt, leichter daran, die Kost aufzunehmen. Auch bei Kostsätzen, bei denen autoklavierte Milch gesondert gegeben wird, leistet dieses Verfahren gute Dienste, da junge Tiere, die keine Milch kennen, diese erst verweigern. Um die Verluste von Tieren durch interkurrente Krankheiten intestinalen Ursprungs während des Versuches nach Möglichkeit herabzusetzen, impfen BRACEWELL, HOYLE und ZILVA (S. 1529) vor Versuchsbeginn alle Tiere mit einem Vakzin, das gleiche Mengen von *B. enteritidis* Gärtner und *B. aertrycke* enthält.

Es empfiehlt sich, für jede Dosis des zu untersuchenden Materials 3, besser 5 Tiere zu verwenden. Zu quantitativen Zwecken sind Gruppen zu 10 Tieren empfehlenswert. Die Meerschweinchen wachsen auf Skorbutkost noch einige Zeit, und zwar je nach der vorherigen Fütterung bis zu etwa 25 Tagen. Die Versuchszeit zwischen dem 20. und 30. Tag ist gewissermaßen die kritische Zeit des Versuches, da in dieser Zeitspanne bei Vitamin-C-Freiheit der Nahrung das Auftreten klinischer Skorbutsymptome, der Gewichtssturz und meist auch schon der Tod erfolgt.

Hat man Meerschweinchen, die schon vorher mit ungenügenden Vitamin-C-Mengen versehen wurden, was z. B. bei angekauften Tieren und dann besonders im Winter der Fall ist, so kann das Wachstum bereits zwischen dem 10. und 20. Tag stocken und Skorbut eintreten. Ältere, reichlich mit Vitamin C ernährte Tiere vermögen eine vitamin-C-freie Ernährung viel länger, bis 60 und mehr Tage ohne äußerlich erkennbare Anzeichen zu ertragen (SCHEUNERT und RESCHKE<sup>1</sup>). Bei Durchführung des Schutzversuches erhalten die Meerschweinchen die zu prüfende Zulage vom ersten Tage an. Es ist notwendig, die Futteraufnahme zu beobachten, und wenn diese nicht befriedigend erscheint, durch zwangsweise Einverleibung von autoklavierter Milch nachzuhelfen. Die Milch wird dazu dem Meerschweinchen langsam aus einer Rekordspritze eingegeben. Sie gewöhnen sich daran leicht. Die Verabreichung des zu prüfenden Materials ist genau zu beachten. Es ist dabei zu fordern, daß dieses rasch und sofort nach dem Vorsetzen von dem Tier gefressen wird. Das Vitamin C ist gegen Oxydation sehr empfindlich (vgl. Bd. 1, S. 920). Längeres Stehen im Käfig, vor allem Austrocknen, können den Vitamin-C-Gehalt des zu prüfenden Materials in kurzer Zeit erheblich vermindern. Es kommt hinzu, daß die Tiere häufig die Zugaben nicht fressen wollen, auch wenn es sich um frisches Obst und

<sup>1</sup> A. SCHEUNERT u. J. RESCHKE: Klin. Wochenschr. 1931 II, 1452.

Gemüse handelt, vor allem aber, wenn solches irgendwie eine Zubereitung (Kochen) oder auch eine längere Aufbewahrung in gefrorenem Zustand erfahren hat. Auch hier hilft gut eine vorherige Auswahl der Versuchstiere. Einer größeren Anzahl von Meerschweinchen ist dazu das Material anzubieten, und nur solche Tiere sind zum eigentlichen Versuch geeignet, die es gut fressen. Den Ausführungen, die v. HAHN (S. 1528) zu diesen Fragen macht und den von ihm gegebenen Vorschriften ist deshalb durchaus zuzustimmen. Auch wir haben oft beobachtet, daß die Tiere besonders dann auf einmal zur Spontanaufnahme bereit sind, wenn sich bei ihnen Vitamin-C-Mangel nach einigen Tagen bemerkbar macht. Führt alles nicht zum Ziel, so muß man zur Zwangsfütterung schreiten.



Abb. 42. Holzgestell für die Zwangsfütterung von Meerschweinchen.

**Zwangsfütterung.** Bei Verabreichung flüssiger Nahrungsmittel und vitamin-C-haltiger Lösungen ist die quantitative Aufnahme am besten durch Fütterung mit der Rekordspritze oder durch eine Pipette zu sichern<sup>1</sup>. v. HAHN (S. 1528) rechnet diese Methode nicht direkt zur Zwangsfütterung. Wie man dieses Vorgehen bezeichnen will, ist im übrigen nebensächlich, und schließlich wird aber doch, vor allem, wenn man eine größere Menge verabreichen muß, ohne Rücksicht, ob das Tier diese Menge noch freiwillig aufnehmen würde oder nicht, die Aufnahme durch aktives Einfüllen in das Maul des Tieres befördert und zeitlich abgekürzt werden müssen. Bei festem Material haben wir die Aufnahme durch Stopfen der Tiere gesichert. Diese werden dazu in ein Handtuch eingewickelt, derart, daß nur der Kopf und die Vorderbeine herausragen und dann auf den Rücken in ein Holzgestell eingelegt, dessen Form und Maße aus Abb. 42 hervorgehen. Mit Hilfe der Finger, einer Pinzette, eines Glasstabes oder eines anderen Instrumentes kann man leicht das Meerschweinchen zu einer geringen Öffnung der Maulspalte veranlassen und dann in diese mit Hilfe eines geeigneten Instrumentes eine kleine Portion des Materials einbringen (vgl. Abb. 43). Durch Rütteln am Gestellchen oder Bewegen des Kopfes oder sonstige Maßnahmen, die die Erfahrung bald ergibt, lassen sich die Tiere leicht zum Kauen und Ab schlucken veranlassen. Auf diese Weise wird den Meerschweinchen nach und nach das gesamte Material beigebracht. Sie gewöhnen sich bald daran. v. HAHN



Abb. 43. Zwangsfütterung von Meerschweinchen.

<sup>1</sup> Größere Mengen flüssiger Nahrungsmittel verabreichen wir neuerdings mit Hilfe eines an einer Rekordspritze befestigten elastischen Katheters direkt in den Magen.

(S. 1528) hält dieses Vorgehen für nicht empfehlenswert, da es nach seiner Ansicht zu Versuchsfehlern führen kann. Wir vermögen dem auf Grund unserer Erfahrungen seit 1920 (SCHEUNERT, SCHIEBLICH und SCHWANEBECK S. 1528) nicht zuzustimmen und konnten bei unseren sehr zahlreichen Versuchen der Zwangsfütterungsmethode eine andere gleich sichere Methode, die Tiere zur quantitativen Aufnahme des zu prüfenden Materials zu bringen, nicht an die Seite stellen.

**Aufbewahrung des Materials.** Wenn es sich darum handelt, ein vegetables Produkt auf seinen Vitamin-C-Gehalt zu prüfen, so ist im Hinblick auf die leichte Zerstörbarkeit dieses Vitamins die Aufbewahrung von Wichtigkeit. Auch kann es sich notwendig machen, eine große Anzahl verschiedener Produkte, die in den wenigen Tagen der Erntezeit anfallen, so lange aufzubewahren, bis sie in den Versuch genommen werden können. Das ideale Vorgehen wäre natürlich das, daß man sofort beim Anfallen der Produkte diese untersucht. Wenn es sich aber um viele Dutzende von Proben handelt, würden dann viele Hunderte von Meerschweinchen und entsprechendes Personal vorhanden sein müssen. Dies gleichzeitig zu bewältigen, dürfte im allgemeinen nicht möglich sein, also muß man zur Aufbewahrung schreiten. Diese ist immer gefährlich und kann zu Verlusten führen. Wir finden ebenso wie DELF<sup>1</sup> und ferner ZILVA<sup>2</sup>, die über diese Fragen außerordentlich große Erfahrungen besitzen, das Einfrieren des Materials bei tiefen Temperaturen unter Vakuum als in dieser Richtung die größte Sicherheit gewährend. Dazu wird das Material (Gemüse, Obst) so rasch wie möglich nach der Ernte in Glasbüchsen, wie sie zur Hitze-sterilisation im Haushalt üblich sind, fest eingedrückt, Gummiringe und Deckel aufgelegt und zwischen diese eine feine Hohnadel eingeschoben, die mit einer Ölvakuumpumpe in Verbindung steht. Alsdann wird scharf evakuiert und schließlich eingefroren, am besten bei  $-20^{\circ}$ . Hat man so tiefe Temperaturen nicht, so muß man sich mit den Temperaturen begnügen, die in modernen Kühlhäusern zur Verfügung stehen und bei etwa  $-8^{\circ}$  liegen. Zu den Versuchen werden diese Gläser aus dem Stapelkühlraum, wo sie aufbewahrt werden, in einen Tiefkühlschrank des Laboratoriums verbracht, daraus entnommen, rasch geöffnet, das für eine Tagesfütterung benötigte Material herausgenommen, die Büchse sofort wieder verschlossen, evakuiert und in den Kühlschrank zurückgestellt. Mit größter Beschleunigung werden die Zugaben abgewogen und an die Versuchstiere verabreicht, nötigenfalls zwangsgefüttert. In den kleinen Portionen, die verwendet werden, findet in den wenigen Minuten, die bis zum Füttern verstreichen dürfen, ausreichende Erwärmung statt, so daß die Meerschweinchen nicht geschädigt werden. Nachdem aus einer Büchse etwa dreimal Material entnommen worden ist, wird der weitere Inhalt verworfen und eine neue Büchse geöffnet und so fort.

v. HAHN (S. 1528) empfiehlt, das anfallende Material frisch sogleich zu verfüttern und während der ganzen Erntezeit immer wieder neu anfallendes Material sofort zu verwenden. Man hat dann natürlich nicht die Gewähr, daß der Vitamin-C-Gehalt immer gleich bleibt. Das muß man dann ebenso in Kauf nehmen, wie die nicht von der Hand zu weisende Möglichkeit, daß trotz aller Sorgfalt und Schnelligkeit der Handhabung bei der Einfriermethode dennoch Verluste eintreten.

Versuchsdauer. Der Versuch ist in der geschilderten Weise mit täglicher Zugabe des zu prüfenden Materials fortzuführen. Sofern die Tiere die kritische Zeit überleben und weitere Gewichtszunahme zeigen, ist möglichst zu verlangen, ihn über 50, besser 60, wenn man ganz sicher gehen will, 90 Tage auszudehnen. Wir haben uns in letzter Zeit mit 50–60 Tagen begnügt.

<sup>1</sup> E. M. DELF: Biochem. Journ. 1925, 19, 141. — <sup>2</sup> ZILVA: Mündliche Mitteilung.

### 3. Skorbutdiagnose.

**a) Klinische Diagnose.** Beim Fehlen des Vitamins C oder ganz ungenügender Vitamin-C-Zufuhr beginnen die Tiere alsbald nach den ersten Tagen ein äußeres Verhalten zu ändern. Sie hocken traurig im Käfig, machen einen müden Eindruck, werden struppig und unsauber. Oft beginnen sie, ohne sich zunächst im äußeren Habitus zu verändern, auch auf dem einen oder anderen Bein zu schonen. Beim Herausnehmen der Tiere fällt dann ein Nachlassen des Turgors, Schlaffheit der Muskulatur, geringe Bewegungsfreudigkeit und Nachlassen der Abwehrbewegungen auf. Bei Befühlen der Sprung-, Knie-, Vorderfußwurzel- und Ellbogengelenke kann man unter Umständen Auftreibungen und Schmerzempfindlichkeit beobachten. Die in der ausländischen Literatur häufig beschriebene Schmerzäußerung durch entsprechende Lautgebung haben wir sehr

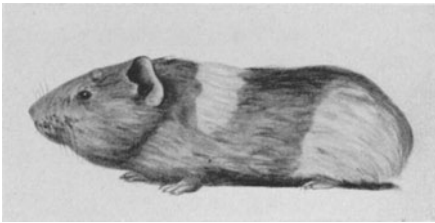


Abb. 44. Gesundes Meerschweinchen.



Abb. 45. Erste Symptome des Skorbuts.

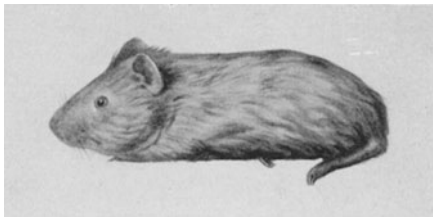


Abb. 46. Ausgeprägter Skorbut, Hinterextremitäten sind entlastet, sog. Skorbutstellung.



Abb. 47. Schwerste klinische Symptome, Endstadium.

oft vermißt. Die Tiere werden immer weniger geneigt, Bewegungen auszuführen und entlasten die schmerzenden Extremitäten, indem sie sich vor allem zunächst auf der Hinterhand auf die Seite legen und die Beine seitwärts strecken. In schweren Fällen nehmen sie völlige Seitenlage ein (Abb. 44—47). Bei größerer, aber noch nicht zureichender Vitamin-C-Zufuhr treten diese Symptome erst später auf, und die Gewichtskurve kann dabei immer noch allmählich ansteigen. Bei ausreichender Vitamin-C-Zufuhr wachsen die Tiere rasch und gut, behalten ihre Lebhaftigkeit, und die Straffheit ihrer Muskulatur ist beim Halten in der Hand auffallend deutlich. Irrtümer können sich dadurch einschleichen, daß die Tiere an Durchfall erkranken, hervorgerufen durch ungewohnte Zulagen. Auch dann werden die Meerschweinchen traurig und verlieren an Straffheit, nehmen ab und werden äußerst hilflos. Will man also bei einem während des Versuchs gestorbenen Tier oder bei solchen, die den ganzen Versuch überdauern haben, sicher feststellen, ob Skorbut vorgelegen hat, so ist die Sektion ein unbedingtes Erfordernis. Ferner empfiehlt es sich zur Sicherung der Schlüsse, eine ausreichende Zahl von Kontrolltieren, die keine Zulage erhalten, anzusetzen und deren Gewichtskurven sowie die Entwicklung der Skorbutsymptome zu verfolgen.

**b) Pathologisch-anatomische Diagnose.** Zur Sicherung der Ergebnisse werden dreierlei pathologisch-anatomische bzw. histo-pathologische Befunde herangezogen:

α) Makroskopische Betrachtung des eröffneten Tieres. Beim Abziehen der Haut von den Extremitäten zeigen sich in schweren Skorbutfällen, namentlich in der Umgebung der Kniegelenke, ausgedehnte Blutungen, die in leichten Fällen nur an einem oder dem anderen Gelenk auftreten können. Die Gelenke sind in der Regel verdickt. Bei Eröffnung des Thorax sieht man Blutungen in der Umgebung der meist verdickten Knochenknorpelsymphysen der Rippen. In mehr chronischen Fällen ist die Rosenkranzbildung besonders ausgeprägt. Rosenkranz wird auch dann beobachtet, wenn der Skorbut bei Ausführung der Sektion noch im Abheilen begriffen ist. Hämorrhagien können ganz fehlen. Blutungen im Darm unterstützen die Diagnose Skorbut, können aber, falls Durchfall bestanden hat, auch auf andere Ursachen zurückzuführen sein. In schweren Fällen sind die Nage- und Backenzähne locker, die letzteren können mit der Pinzette leicht herausgezogen werden. Die für den menschlichen Skorbut charakteristischen Blutungen des Zahnfleisches finden wir nur selten. Nach unserer Ansicht genügt die sorgfältige Überprüfung des getöteten oder gestorbenen Tieres auf diese Symptome durchaus zur Stellung der Diagnose. Zu ihrer Sicherung werden noch andere Untersuchungen empfohlen.

β) Entkalkung und dadurch Brüchigwerden der Röhrenknochen wird häufig beobachtet, was sich zuweilen schon makroskopisch durch Spontanfrakturen, namentlich an den Gelenkköpfen, bemerkbar macht. Histologisch findet man nach 2—3 Wochen Veränderungen besonders an den Knochenknorpelsymphysen der Rippen, charakterisiert durch verschieden starke Unregelmäßigkeit der Symphysen als Ganzes, leichte Störungen in der Anordnung und gewöhnlich Verkürzung der Knorpelzellen- und Knochenbälkchenreihen, ferner vermehrten Blutgehalt der Markhöhle und Verminderung der Knochenstärke, besonders in der Nähe der Symphyse. In späteren Stadien treten diese Erscheinungen immer deutlicher hervor.

Insbesondere hat TOZER<sup>1</sup> diese Verhältnisse studiert und eine Gradeinteilung gegeben, doch sei darauf hingewiesen, daß in milden Fällen Täuschungen dadurch vorkommen können, daß Vitamin-A-Mangel besteht, bei dem ähnliche Veränderungen auftreten. In schweren Fällen wird aber durch Hämorrhagien in der Markhöhle, Frakturen und Auftreten von Bindegewebe an den Rippen-symphysen eine klare Erkennung der skorbutischen Veränderungen ermöglicht. Ausführliche Beobachtungen hierüber brachte HÖJER<sup>2</sup> bei.

γ) Als besonders zeitiges Symptom des Vitamin-C-Mangels ist die Veränderung der histologischen Zahnstruktur bekannt (JACKSON und MOORE<sup>3</sup>, ZILVA und WELLS<sup>4</sup>). HÖJER<sup>5</sup> hat darauf eine Methode zur Bestimmung des Vitamins C aufgebaut. Die Veränderungen zeigen sich besonders im Dentin, Prädentin und in den Odontoblasten. Bei der Färbung von Schnitten der Schneidezähne kann man die Unterschiede deutlich feststellen. Das innere Dentin ist dann mehr oder weniger unregelmäßig breit und mit Vorsprüngen in die Pulpa versehen; das Prädentin ist verkalkt; die Odontoblasten sind desorganisiert und die TOMESSchen Kanäle finden sich nur im äußeren Dentin. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, den Skorbutgrad, der aus der Betrachtung

<sup>1</sup> F. M. TOZER: Biochem. Journ. 1918, 12, 445; 1921, 15, 28. — Journ. Path. Bact. 1921, 24, 306.

<sup>2</sup> J. A. HÖJER: Acta paedriat. Vol. 3, Suppl. 1924, S. 34.

<sup>3</sup> L. JACKSON and J. J. MOORE: Journ. Infect. Dis. 1916, 19, 478.

<sup>4</sup> S. S. ZILVA and F. M. WELLS: Proc. Roy. Soc. B. 1919, 90, 505.

<sup>5</sup> J. A. HÖJER: Brit. Journ. exp. Path. 1926, 7, 356.

der Hämorrhagien nicht sicher erschlossen werden kann, genau auszuwerten. KEY und ELPHICK<sup>1</sup> haben ein Schema für eine solche Beurteilung verschiedener Skorbutgrade ausgearbeitet. Eine histologische Methode unter Benutzung der Backenzähne beschreibt GÖTHLIN<sup>2</sup>.

c) **Röntgenologische Diagnose.** Die hierzu geeignete Methode wurde von GÖTHLIN<sup>2</sup> in Gemeinschaft mit SUNDBERG im Jahre 1929 ausgearbeitet und später von anderen Autoren (NAESLUND<sup>3</sup>, RYGH<sup>4</sup>, v. EULER<sup>5</sup> und ZILVA<sup>6</sup>) aufgegriffen. Sie beruht darauf, daß bei bestehendem Skorbut an den Knochenknorpelsymphysen der Rippen in einer bandartigen Zone eine stärkere Absorption der Röntgenstrahlen auftritt. Bei gesunden Tieren unter 400 g ist die Zone nur sehr schmal und überschreitet  $\frac{1}{3}$  mm nicht, bei schwereren Tieren (400—550 g) ist sie nicht breiter als  $\frac{1}{2}$  mm. Die bei skorbutkranken Meer-schweinchen verbreiterte Zone ist außerdem in einer großen Anzahl der Fälle gegen den knorpeligen Teil der Rippe konkav eingezogen. Zwecks Vornahme der Röntgenaufnahme werden zunächst alle Muskeln von der Thoraxwand abpräpariert und die „Brustplatte“ herausgeschnitten, wobei die Rippen nahe der Wirbelsäule abgetrennt werden und mit dem Brustbein in Verbindung bleiben. Die frische, nicht mit Formalin behandelte Brustplatte wird dann mit ihrer Vorderseite glatt auf den Film gelegt und die Röntgenaufnahme angefertigt. Von den Filmen werden Abzüge auf hartem Papier hergestellt. Die oben beschriebenen Bänder erscheinen dann dunkel.

Die röntgenologische Methode kommt zwar der mikroskopischen Untersuchung der Zähne an Empfindlichkeit keineswegs gleich, ist aber der makroskopischen Betrachtung und der Palpation der Rippenknochenknorpelsymphysen etwas überlegen. GÖTHLIN glaubt, daß im allgemeinen die Durchführung der röntgenologischen Untersuchung ausreichend sein dürfte und daß die mikroskopische Untersuchung der Zähne nur auf Fälle mit negativem Ausfall dieser Untersuchung beschränkt bleiben kann.

#### 4. Bewertung des Vitamin-C-Gehaltes.

Für Fälle, in denen ein Schutz überhaupt nicht erzielt wird, haben SHERMAN, LA MER und CAMPBELL (S. 1529) ein Beurteilungsschema aufgestellt, das die Körpergewichtsbewegung während des Versuches, die Dauer des Experimentes, die Symptome und Sektionsbefunde, die sich auf Betrachtung des Knochensystems (Kinnbacken, Zähne, Rippen, Gelenke) stützen, sowie das Auftreten von Hämorrhagien (Rippen, Darm, Gelenke, Muskeln) berücksichtigt. Man kann mit Hilfe dieses Systems den Grad der Veränderungen quantitativ beurteilen. Zur Ausarbeitung dieses Schemas verwendeten die Autoren eine vitamin-C-freie Kost, der verschieden gestaffelte Dosen (0,1, 1,5, 2 und 3 ccm) von Tomatensaft zugegeben worden waren, dessen Vitamin-C-Gehalt aber nicht genügte, um vollen Schutz hervorzurufen.

**Quantitative Auswertung.** Bei der quantitativen Auswertung kommt es bei unserem Vorgehen darauf an, diejenigen Mengen zu ermitteln, die die Tiere über eine Versuchsdauer von 60 Tagen gerade sicher vor Skorbut schützen. Es ist dazu notwendig, stets mehrere Gruppen von Tieren mit gestaffelten

<sup>1</sup> K. M. KEY and G. K. ELPHICK: Biochem. Journ. 1931, **25**, 888.

<sup>2</sup> G. F. GÖTHLIN: Antiscorbutic potency of vegetable products. Acta med. scand. (Stockh.), Suppl. **53**, 1933.

<sup>3</sup> C. NAESLUND: Uppsala Läk.för. Förh., N. F. 1931, **36**, 407.

<sup>4</sup> O. RYGH: Avhandl. utg. av det Norske Videnskaps-Akademi i Oslo, Mat.-Naturv. Klasse, **1931**, Nr 8.

<sup>5</sup> H. v. EULER u. M. RYDBOM: Biochem. Zeitschr. 1932, **249**, 149.

<sup>6</sup> R. L. GRANT, S. SMITH and S. S. ZILVA: Biochem. Journ. 1932, **26**, Plate VI.



Dosen laufen zu lassen und die Tiere dann am Ende des Versuches der Sektion zu unterwerfen. Außerdem dient die Feststellung der Gewichtskurve, die durch zweimalige Wägung in der Woche erhalten wird, dazu, schon während des Versuchesverlaufes den Erfolg zu beurteilen. Tiere, die ungenügende Zugaben erhalten, wachsen schlechter oder stellen das Wachstum allmählich ein und zeigen dann Gewichtsabfall. Bei ganz ungenügenden Dosen tritt noch während des Versuches der Tod ein. Selbstverständlich kann man die oben gestellte Forderung dadurch verschärfen, daß man die Versuchsdauer verlängert und 90 Tage Dauer als Grenze stellt, wie z. B. von ZILVA (S. 1529) unter Verwendung von 6 Tieren für jede zu prüfende Dosis empfohlen wird. Uns scheint die dadurch bedingte starke Erschwerung und Verteuerung des Versuches nicht im Einklang mit dem erzielten Erfolg zu stehen.

Früher sind wir auch so vorgegangen, daß wir bei einer Gruppe von Tieren (mindestens 3) mit einer Dosis, die gerade etwas unter dem Optimum liegend angesehen werden konnte, den Versuch begannen. Dann wurde nach dem klinischen Verhalten und den Gewichtskurven der Meerschweinchen der Skorbutbeginn festgestellt und hierauf die Dosis in Zwischenräumen allmählich derart erhöht, bis keine klinischen Symptome mehr zu beobachten waren und das Wachstum normal erschien. Mit dieser Dosis wurde der Versuch dann bis zum 90. Tage fortgesetzt und das Ergebnis durch den klinischen Befund und die Sektion erhärtet. Bei diesem Vorgehen spart man Tiere und damit Zeit und Versuchsmaterial, doch sind dagegen Einwände zu erheben, da die Tiere durch die zu geringen Dosen leicht an Skorbut erkranken und immerhin geschädigt werden. Auch tritt dann oft die Form des chronischen Skorbut auf, und man kann am Ende nicht sicher aus dem Sektionsbefund erkennen, ob die zuletzt gegebene Dosis wirklich genügt hat oder doch etwas zu niedrig war. Immerhin gibt dieses Vorgehen zur ungefähren Orientierung bei Materialknappheit brauchbare Anhaltspunkte, was wir trotz aller Einwände, wie wir ausdrücklich betonen, aufrechterhalten. Da bei der Untersuchung natürlicher Nahrungsmittel der Vitamingehalt je nach der Herkunft sowieso Schwankungen aufweist und die benötigten Mengen oft ziemlich groß sind, ist der mögliche Fehler verhältnismäßig gering.

Methode nach REYHER<sup>1</sup>. REYHER verfährt in der Weise, daß gleichzeitig verschiedene Dosen des zu untersuchenden Materials geprüft werden, derart, daß diese so lange verabreicht werden, bis die Tiere an Skorbut eingehen. Beim Vergleich der Anzahl der Versuchstage, die bis zum Tode der Meerschweinchen verstreichen, ist eine quantitative Beurteilung möglich.

Methode nach v. HAHN<sup>2</sup> (S. 1528). v. HAHN gibt ausführliche Vorschriften. Zu orientierenden Versuchen werden 6 Meerschweinchen benutzt, von denen je 1 Paar mit der gleichen Menge des zu untersuchenden Stoffes gefüttert wird. Für genaue Versuche werden 5 Tiere je Dosis in den Versuch genommen und mindestens 4 verschiedene Mengen geprüft. Er legt größten Wert darauf, daß gleichzeitig eine positive Kontrolle mit einem sicheren Antiskorbuticum und eine negative Kontrolle ohne jede Vitamin-C-Zugabe läuft. Als sicheres Antiskorbuticum ist Apfelsinen- oder Citronensaft zu wählen, der in Mengen von 1 ccm (frisch ausgepreßt) genügt, um Tiere jahrelang skorbutfrei zu halten. Da die negativen Kontrollen binnen 40—44 Tagen an Skorbut eingehen, nachdem sie etwa vom 22. Tage ab rapid an Körpergewicht abgenommen haben, wird für Versuche, in denen die Anwesenheit von Vitamin C dargetan werden soll, eine Versuchszeit von 6 Wochen als ausreichend erachtet. Wenn nach dieser Zeit noch befriedigende Gewichtszunahme bestanden hat und die Sektion Skorbutfreiheit ergibt, so muß unbedingt Vitamin C vorhanden sein. Zur Erlangung einer sicheren Entscheidung, ob eine ausreichende Menge Vitamin C vorhanden gewesen ist, ist nach v. HAHN<sup>2</sup> (S. 1528) unbedingt eine 90 tägige Versuchszeit zu fordern. Zur Bewertung der Versuche verwendet v. HAHN den Gewichtsverlauf (Wachstumsziffern) und die Sektionsprotokolle, wobei Meerschweincheneinheiten errechnet werden. Das Vorgehen hierzu ist

<sup>1</sup> Siehe Fußnote 7, S. 1524. — <sup>2</sup> F.-V. v. HAHN: Z. 1931, 61, 545.

infolge der vielen Fehlermöglichkeiten, die ausgeschaltet werden müssen, von v. HAHN sehr sorgfältig beschrieben worden. Die Wachstumsziffern werden derart gewonnen, daß mit einem Transporteur bestimmt wird, wie die durchschnittliche Richtung der einzelnen Gewichtskurven innerhalb des bei fehlerfrei durchgeführten Versuchen zwischen der Gewichtskurve der positiven Kontrolle (1 ccm Apfelsinensaft täglich) und derjenigen der negativen Kontrolle befindlichen rechten Winkels liegt. Die gefundene Richtung wird in % angegeben, wobei die Richtung der negativen Kontrolle = 0, diejenige der positiven Kontrolle = 100 gesetzt wird. Die Kurven, die steiler abfallen als die der jeweiligen negativen Kontrolle, werden mit „minus“ bezeichnet. Die Stärke des Skorbut wird in Zahlen angegeben, wobei 0 = skorbutfrei, 1 = leichter Skorbut, 2 = mittelstarker Skorbut und 3 = starker Skorbut bedeuten. Als Meerschweinchen-einheit (ME.) wird die Tagesmenge eines untersuchten Stoffes bezeichnet, die genügt, um Meerschweinchen vor Skorbut zu schützen. 100 g, dividiert durch diese Menge, gibt dann die ME. je 100 g.

Zum Ausdruck des Vitamin-C-Gehaltes kann man auch ungefähre Angaben heranziehen. So haben wir bei unseren ersten Arbeiten, denen eine quantitative Auswertung in modernem Sinne nicht zugrunde lag, einem Stoff die Bewertung „sehr gut“ gegeben, wenn von ihm bis 3 g die Meerschweinchen skorbutfrei hielten. Wurden 4–10 g benötigt, so wurde der Vitamin-C-Gehalt als „gut“, bei 11–25 g als „gering“, darüber hinaus als „sehr gering“ oder als „Spur“ bezeichnet. v. HAHN setzt die Grenzen schärfer, da er den im übrigen kaum einwandfrei festgelegten Bedarf des Menschen an Vitamin C zugrunde legt. Liegt die vor Skorbut sicher schützende Menge eines Stoffes bei 0,5 g, so bezeichnet v. HAHN seinen Vitamin-C-Gehalt als außerordentlich hoch, liegt sie bei 0,6–2 g, als sehr gut, 3–6 g als gut, 6–12 g als gering. Mengen von über 12 g zeigen nach seiner Ansicht an, daß der Vitamin-C-Gehalt praktisch belanglos ist, da davon mindestens 600 g von einem Menschen aufgenommen werden müßten, wenn er damit allein seinen Vitamin-C-Bedarf decken wollte. Also man sieht, daß alle diese Meßversuche nur einen sehr bedingten Wert besitzen, deshalb muß man auch hier von der biologischen Einheit abgehen und ein Standardpräparat heranziehen. Dazu würde jetzt zweifellos die Ascorbinsäure (vgl. Bd. 1, S. 95) sehr geeignet sein.

Methode nach GÖTHLIN<sup>1</sup>. Bei seinen hauptsächlich den Vitamin-C-Gehalt von Beerensäften betreffenden Untersuchungen verwendete GÖTHLIN, sofern es sich um gesüßte Säfte handelte, die Originalskorbutkost nach SHERMAN, LA MER und CAMPBELL (S. 1529), weil dann der an sich in dieser Kost vorhandene Überschuß an Eiweiß für eine günstige Gestaltung des Verhältnisses zwischen Eiweiß und Kohlenhydrat willkommen war. Bei ungesüßten Fruchtsäften modifizierte er die Kost, um den Eiweißgehalt zu verringern, in der folgenden Weise:

|   |      |
|---|------|
| Hafer, gemahlen . . . . .   | 50 g |
| Weizenkleie . . . . .   | 24 g |
| Magermilchpulver, in einem Autoklaven in trockener Luft<br>2 Stunden lang in einer 1 cm in der Dicke nicht über-<br>schreitenden Schicht auf 110° erhitzt . . . . . | 15 g |
| Butterfett . . . . .  | 10 g |
| NaCl . . . . .  | 1 g  |

Die zu den Versuchen benutzten Meerschweinchen hatten ein Gewicht von 230–340 g. In der Regel wurden für jede Versuchsserie 20 Stück verwendet. Die Versuchsdauer betrug 50 Tage.

Zubereitung, Aufbewahrung und Verabreichung der Beerensäfte. Die Beeren wurden zuerst gemahlen, in einem Tuch ausgepreßt und dann nochmals durch ein

<sup>1</sup> Siehe Fußnote 2, S. 1535.

anderes Tuch filtriert. Der erhaltene Saft wurde in Flaschen gefüllt und, so lange reife Beeren erhältlich waren, sogleich verwendet. Da der Versuch jedoch länger fortgeführt werden mußte, wurden die Säfte für den Rest der Versuchsdauer durch Zusatz von 1 g Natriumbenzoat auf 1 l konserviert. Die Säfte wurden in vorher sterilisierten Flaschen bei Temperaturen von 1–4° im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Verabreichung der Säfte an die Meerschweinchen geschah mit Hilfe von Pipetten. Die Tagesdosis überschritt in keinem Fall 9 ccm. Um von vitamin-C-armen Säften größere Dosen prüfen zu können, wurden sie in dem von GAEDE und STRAUB<sup>1</sup> konstruierten Schnelltrockenapparat in der Regel auf  $\frac{1}{4}$  eingeeengt.

Die Beurteilung des Versuchsergebnisses geschah mit Hilfe der Wachstumskurven, der klinischen und pathologisch-anatomischen Symptome, sowie der mikroskopischen Untersuchung der Zähne und röntgenologischen Untersuchung der Rippenknochenknorpelsymphysen (vgl. S. 1535).

Internationale Einheiten (vgl. S. 1554). Die internationale Vitamin-konferenz, bei deren Tagung die Ascorbinsäure noch nicht entdeckt war, wählte nach dem Vorschlag von ZILVA als demjenigen Autor, der die größten Erfahrungen auf diesem Gebiet besaß, als Standardpräparat den Saft der Citrone, also der Frucht von *Citrus limonum*.

Der als Standardlösung frisch ausgepreßte Citronensaft wird durch Musselin filtriert und mit Calciumcarbonat im Überschuß bis zum Aufhören der Gasentwicklung versetzt. Die Mischung bleibt eine Stunde stehen und wird dann durch einen BÜCHNER-Trichter filtriert. Dadurch ist dem Saft die Citronensäure entzogen und seine Reaktion beträgt ungefähr  $p_H = 6,0$ . Innerhalb 2 Stunden nach der Filtration ist diese Standardlösung zu benutzen. 1 ccm davon täglich an ein Meerschweinchen verabreicht, genügt im allgemeinen, um dieses vor Skorbut zu schützen. Die Aktivität von 0,1 ccm solchen decitrierten Citronensaftes wird als 1 internationale Einheit angesehen. Bei der Ermittlung der internationalen Einheiten handelt es sich also darum, die Wirkung des zu prüfenden Präparates mit der des Standard-Citronensaftes zu vergleichen. Dies kann auch wieder dadurch geschehen, daß die Grenzdosen, die gerade Skorbutschutz über eine bestimmte Zeit sichern, ermittelt werden. Hierzu eignen sich die oben beschriebenen Methoden.

#### Heilversuch.

Auch der Heilversuch ist zum Studium des Vitamin-C-Gehaltes verwendet worden. Das Vorgehen bedarf einer näheren Beschreibung nicht, da ihm eine größere Verwendungsfähigkeit zur Zeit abzuspochen ist. Es gibt kein sicheres Kriterium für den zeitlichen Eintritt eines gleichmäßig schweren Vitamin-C-Mangels beim Meerschweinchen, da dazu Gewichtskurven und klinischer Befund bei lebenden Tieren nicht ausreichen. Der Heilerfolg wird aber durch die Schwere der Erkrankung wesentlich beeinflusst, weil schwer erkrankte Tiere häufig selbst durch hohe Vitamin-C-Gaben nicht mehr gerettet werden können. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn schwere Darmschädigungen eingetreten sind. Dann sind Durchfälle, die zum Tode führen, leicht durch die Zugabe des zu prüfenden Materials auslösbar. Ferner ist es, wenn man Heilung erzielt und dann nicht sehr lange die heilenden Dosen verabreicht, oft nicht möglich, festzustellen, ob wirklich vollständige Heilung erfolgt ist oder doch noch chronischer Skorbut besteht. Insbesondere bleiben Knochenveränderungen, wie Rosenkranz und Gelenkverdickungen, bestehen und trüben den Sektionsbefund. Deshalb kann zur Zeit dieses Vorgehen nicht empfohlen werden.

#### 5. Titrationsmethode nach TILLMANS (vgl. S. 1551).

TILLMANS<sup>2</sup> und seine Schüler haben festgestellt, daß in vitamin-C-haltigen Naturprodukten ein schwach reduzierender Körper vorkommt, der gleiches

<sup>1</sup> W. GAEDE u. W. STRAUB: Biochem. Zeitschr. 1925, 165, 247.

<sup>2</sup> J. TILLMANS: Z. 1930, 60, 34. — F. SIEBERT: Dissertation, Frankfurt a. M. 1931. — J. TILLMANS u. P. HIRSCH: Biochem. Zeitschr. 1932, 250, 312. — J. TILLMANS, P. HIRSCH u. J. JACKSCH: Z. 1932, 63, 241, 276. — J. TILLMANS, P. HIRSCH u. H. DICK: Z. 1932, 63, 267. — J. TILLMANS, P. HIRSCH u. R. VAUBEL: Z. 1933, 65, 145. — J. TILLMANS u. P. HIRSCH: Naturwissenschaften, 1933, 21, 314.

Verhalten besitzt wie das Vitamin C, also mit ihm identisch ist. Der reduzierende Körper vermag den Farbstoff 2,6-Dichlorphenol-indophenol zu reduzieren und kann mit Hilfe dieses Farbstoffes titrimetrisch bestimmt werden. Im folgenden geben wir die Vorschrift für die Durchführung der Titrationsmethode nach den neuesten Erfahrungen wieder, wie sie uns von Herrn Professor TILLMANS liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt wurde.

Für die Titration der Ascorbinsäure (Vitamin C) hat sich von verschiedenen geprüften Indophenolfarbstoffen am besten das 2,6-Dichlorphenol-indophenol bewährt. Das im Handel erhältliche Produkt (Th. Schuchardt-Görlitz) ist nicht rein. Zur Herstellung von 1 Liter ungefähr 0,001 N.-Lösung übergießt man etwa 0,25 g Substanz mit Wasser (oder auch Phosphatpufferlösung von Stufe 7,0), läßt über Nacht stehen und filtriert dann das Ungelöste ab. Der Rückstand wird nochmals mit Wasser behandelt. Es ist zu empfehlen, die Lösung im Eisschrank aufzubewahren und jeweils nicht mehr davon herzustellen, als in ungefähr 3 Wochen verbraucht wird, weil bei längerem Stehen der Lösung in dieser rosa bis bräunlich gefärbte Zersetzungsprodukte auftreten, die die Erkennung des Umschlages bei der Titration beeinträchtigen.

Einstellung der Farblösung. Die Einstellung kann mittels Ferrosalzes, Titantrichlorids, sowie auch Natriumthiosulfats erfolgen; am bequemsten ist die Einstellung mittels Ferrosalzes.

a) Einstellung mittels Ferrosalzlösung. Ferrosalz für sich allein reduziert den Farbstoff nicht vollständig. Durch Zusatz von organischen Salzen kann jedoch das Reduktionsvermögen so weit verstärkt werden, daß die Umsetzung quantitativ verläuft. Man bereitet durch Einwiegen von MOHR'schem Salz eine 0,01 N.-Lösung, die man mit Schwefelsäure schwach ansäuert und unter Stickstoff aufbewahrt. Beim Stehen im Dunkeln hält sich diese Lösung mindestens 3 Monate lang. Sie kann ihrerseits mittels Kaliumpermanganat kontrolliert bzw. eingestellt werden.

Eine abgemessene Menge Farbstofflösung (10 ccm) wird mit 5 ccm gesättigter Natriumoxalatlösung versetzt und dann aus einer Fein-Bürette mit obiger Ferrosalzlösung bis zur Entfärbung titriert. Die Titration darf nicht in direktem Sonnenlicht oder zu hellem Tageslicht ausgeführt werden, weil sonst der bereits reduzierte Farbstoff schnell wieder gebläut wird, wodurch Fehler entstehen. Ferner soll die Titration nicht länger als etwa  $\frac{3}{4}$  Minute dauern.

b) Einstellung gegen Titantrichlorid. Die zum Titrieren dienende, sehr luftempfindliche Titantrichloridlösung wird von KNECHT und HIBBERT stets unter Kohlensäure gehalten. Für den vorliegenden Zweck genügt es jedoch auch, die Titanlösung jedesmal frisch aus der käuflichen Lösung zu verdünnen und einzustellen. Man verdünnt die käufliche, salzsaure 15%ige Titantrichloridlösung auf das 100fache oder noch stärker, die etwa 0,01-normale oder auch noch dünnere Titantrichloridlösung wird gegen 0,01 N.-Ferrisalzlösung eingestellt (4,8221 g Ferriammoniumsulfat  $(\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O})$  in 0,02 N.-Schwefelsäure zu 1 Liter gelöst). Wegen der Luftempfindlichkeit der Titanlösung wird möglichst rasch hintereinander einerseits die Titanlösung gegen die 0,01 N.-Ferrisalzlösung, andererseits die Farbstofflösung gegen die Titanlösung titriert, z. B. in folgender Weise:

$\alpha$ ) 5 ccm 0,01 N.-Ferrilösung werden mit 5 ccm Schwefelsäure (1:3) und 5 ccm 10%iger Rhodankaliumlösung versetzt und mit einer ungefähr 0,01 N.-Titantrichloridlösung auf Farblos titriert.

$\beta$ ) 20 ccm Farbstofflösung werden mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt, so daß die Farbe nach Rot umschlägt, dann mit so viel Natriumacetat, daß die Farbe wieder blau wird und während der Titration auch blau bleibt. Sodann wird mit der Titanlösung auf Verschwinden der blauen Farbe titriert (Natriumacetatzusatz wegen des Salzsäuregehaltes der Titanlösung).

c) Über die Einstellung mittels Natriumthiosulfats, die unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen ebenfalls möglich ist, vgl. Dissertation H. DICK, Frankfurt a. M. 1932.

Ausführung der Titration. In neutraler Lösung verläuft die Reaktion zwischen der Ascorbinsäure und dem Farbstoff zu langsam. Alkalische Reaktion der Lösung ist bei der Titration auszuschließen, weil einerseits der reduzierende Stoff dann sehr empfindlich, andererseits auch der Leukofarbstoff stark oxydabel ist. Stark mineralisaure Lösungen von etwa  $p_H < 1,7$  (in Natriumbisulfatlösung) sind ebenfalls für die Titration nicht geeignet, weil durch starke Mineralsäure der Farbstoff schnell zerstört wird. Für die Titration kommt also saure, jedoch nicht zu stark saure Reaktion in Frage.

a) Titration in schwach saurer Lösung. Bei schwach saurer Reaktion (Essigsäure + viel Natriumacetat) ist der Farbstoff rein blau. Bei stärker saurer Reaktion schlägt der Farbstoff über Violett nach Rosa um (ungefähr bei Stufe 4—5). Die blaue Form des Farbstoffes ist intensiver gefärbt als die rote, auch ist das Blau in den meisten Pflanzenauszügen leichter wahrzunehmen als der Umschlag nach Rosa. Es ist deshalb ratsam, im allgemeinen mit der blauen Form zu titrieren und die Lösung hierzu so vorzubereiten, daß sie sauer gegen Lackmus ist, daß der einfallende Tropfen aber noch blau bleibt. Bei sauren Flüssigkeiten, wie z. B. Zitronensaft, geschieht das Abstumpfen durch Zugabe von Natriumacetat (fest oder in konzentrierter Lösung). Zu neutralen Lösungen gibt man vor der Titration etwas verdünnte Essigsäure (1%ig) und nach Bedarf noch etwas Natriumacetat.

b) L. J. HARRIS hat darauf hingewiesen, daß gewisse störende Stoffe durch Titration in kräftig saurer Lösung ausgeschaltet werden können. Offenbar ist dies in der Tat in gewissen Fällen zutreffend, doch kann ein abschließendes Urteil hierüber noch nicht abgegeben werden, weil die Untersuchungen über diese Frage noch nicht beendet sind. Da die Ascorbinsäure in schwach saurer Lösung genau so viel titriert wie in kräftig saurer Lösung, muß, wenn in bestimmten Fällen Unterschiede zwischen der Titration in kräftig saurer und der Titration in schwach saurer Lösung auftreten, angenommen werden, daß der höhere Wert von andersartigen Beimengungen beeinflusst ist. In diesen Fällen ist der niedrigere Wert als der richtigere anzusehen.

c) Titration gefärbter Lösungen (z. B. Heidelbeersaft, Auszug von roten Rüben usw.). Die meisten Pflanzenfarbstoffe sind in organischen Lösungsmitteln unlöslich, die saure Form (rote) des Indophenolfarbstoffes hingegen kann durch organische Lösungsmittel ausgeschüttelt werden. Am besten bewährte sich hier das Nitrobenzol. In Zentrifugenröhrchen von etwa 1,5 cm lichter Weite werden je 5 ccm Nitrobenzol mit dem verdünnten Auszug überschichtet. Vor der Titration mit der Farblösung wird mit wenigen Tropfen 20%iger Essigsäure angesäuert. Der Zusatz der Farblösung erfolgt vorsichtig ohne Umschütteln. Die Verteilung in der wäßrigen Phase geschieht lediglich durch leichtes Umschwenken. Nach  $\frac{1}{2}$  Minute wird vorsichtig und nicht zu heftig geschüttelt, so daß immer noch eine kleine Menge Nitrobenzol am Boden des Röhrchens bleibt. Nach kurzem Stehen trennen sich die beiden Flüssigkeiten wieder. Tritt bei dem einen oder dem anderen Stoffe nach dem Schütteln Emulsionsbildung auf, so führt die Zuhilfenahme der Zentrifuge zur Schichten-trennung immer zum Ziel. Der Umschlag von Grünlichgelb nach Rötlichgelb ist bei einiger Übung gut zu erkennen, besonders neben einem Parallelversuch ohne Farblösung.

Herstellung der Pflanzenauszüge. Nur ausnahmsweise ist das zu untersuchende Objekt eine Flüssigkeit, die ohne weiteres titriert werden kann.

Meist handelt es sich darum, aus Pflanzenmaterial, sei es in rohem, sei es in irgendwie verarbeitetem oder zubereitetem Zustand, einen Auszug herzustellen, der die Ascorbinsäure enthält. Man kann solche Auszüge auf verschiedene Weise herstellen. Zur Beurteilung des Vitamingehaltes wird diejenige Art des Extrahierens benutzt, die die größte Menge an reduzierendem Stoff liefert. In dieser Hinsicht hat sich am besten das Auskochen mit verdünnter Schwefelsäure bewährt. Es wird hierbei in folgender Weise verfahren:

Die möglichst zerkleinerte Substanz wird mit  $2\frac{1}{2}\%$  iger Schwefelsäure übergossen, wobei wenigstens so viel Flüssigkeit anzuwenden ist, daß die Substanz vollständig davon bedeckt wird. In einem ERLENMEYER-Kolben, der mit doppelt durchbohrtem Stopfen versehen ist, wird dann unter Durchleitung von Stickstoff 10 Minuten lang gekocht, dann unter Stickstoff durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt. Die Flüssigkeit wird durch ein Sehtuch gegossen, möglichst gut abgepreßt und mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Ein aliquoter Teil der Lösung wird titriert, nachdem die darin enthaltene Schwefelsäure mittels Natriumacetat abgestumpft ist.

Durch wiederholte Ausführung der angegebenen Extraktionsbehandlung gewinnt man die in dem Extraktionsrückstand noch zurückgehaltenen Mengen an reduzierender Substanz, bzw. überzeugt sich davon, daß dieselbe vollständig ausgezogen ist. In vielen Fällen enthält schon der erste Kochauszug praktisch die gesamte Menge des reduzierenden Stoffes. Bei Materialien von festerer Beschaffenheit (z. B. Wurzel- und Stengelgemüse) sind jedoch 2 oder auch 3 Kochungen nacheinander erforderlich, um durch weitergehende Zerstörung der Pflanzenzellen die Gesamtheit des reduzierenden Stoffes zu erfassen.

Störende Stoffe, „ziehende Titration“. Im Citronensaft wird durch die Indophenoltitration offenbar nur die Ascorbinsäure erfaßt. Auch in anderen Fällen, bei frischen Pflanzensäften und -auszügen, darf dies angenommen werden. Allem Anschein nach gibt es aber in gewissen Pflanzenauszügen außer dem Vitamin C noch andere Stoffe, die die Titration mehr oder weniger beeinflussen. Mit dieser Frage und mit Versuchen, für diese Fälle die Titration spezifischer zu gestalten, sind TILLMANS und Mitarbeiter beschäftigt.

Besonders tritt in einer Reihe von Fällen am Ende der Titration eine weitergehende, langsam verlaufende, „ziehende“ Entfärbung des Farbstoffes auf. Dies ist vor allem bei solchen Produkten bzw. Auszügen der Fall, die durch längere Lagerung oder Luftenwirkung eine mehr- oder weniger weitgehende Zerstörung ihres Vitamingehaltes erfahren haben. Je nach der Stärke, in der diese Erscheinung auftritt, wird die Erkennung des Endpunktes der Titration erschwert, unsicher und manchmal sogar unmöglich gemacht. Derartige „ziehende Titration“ tritt z. B. bei Auszügen aus Zwiebel und Sellerie ein.

In vielen Fällen solcher „ziehender Titrations“ läßt sich trotzdem ein Titrationswert für den Vitamin-C-Gehalt gewinnen, wenn natürlich auch mit verminderter Genauigkeit. TILLMANS und Mitarbeiter gehen in solchen Fällen zur Zeit nach der im folgenden geschilderten Arbeitsweise vor, von der sie aber ausdrücklich betonen, daß den damit gewonnenen Werten ein mehr oder weniger hoher Unsicherheitsfaktor anhaftet. Der Arbeitsweise liegt die Überlegung zugrunde, daß die Ascorbinsäure den Farbstoff in glatt und schnell verlaufender Reaktion entfärbt, so wie dies z. B. bei der Titration von frischem Citronensaft zu beobachten ist. Die „ziehende Titration“ verläuft sehr viel langsamer, woraus zu schließen ist, daß sie auf der Anwesenheit anderer Stoffe oder von Umwandlungsprodukten des Vitamins C beruht. Sie ist daher bei der Bestimmung des Vitamins C nicht zu berücksichtigen. Es wird also nur in Rechnung gesetzt, was sofort mit dem Farbstoff reagiert. Dabei ist darauf zu achten, daß die

Lösung nicht zu schwach sauer ist. Die Grenze zwischen schnell und langsam verlaufender Reduktion kann allerdings je nach den Umständen mehr oder weniger unscharf sein.

Anwesenheit von Ferroeisen. Kleine Mengen von Ferroeisen, wie sie bei der Zubereitung der Gemüse durch die Anwendung eiserner Geräte in das Produkt gelangen können, reduzieren ebenfalls den Indophenolfarbstoff. Sie lassen sich, wie TILLMANS in Gemeinschaft mit BEIER feststellte, mittels einer Methylenblaulösung titrieren, wobei die Ascorbinsäure nicht mit reagiert.

Eine etwa 0,001 N.-Lösung von Methylenblau (I ad Höchst) in luftfreiem Wasser wird in einer Vorratsflasche aufbewahrt, die dauernd unter Stickstoff steht und aus der die Lösung direkt in eine, ebenfalls unter Stickstoff stehende Bürette abgelassen werden kann. Die zu untersuchende Lösung wird in einem von Stickstoff durchströmten Kölbchen zur Entfernung des Sauerstoffes ausgekocht und darin wieder erkalten gelassen. Auf 100 ccm Lösung werden 3—5 ccm (höchstens 10 ccm) 5%ige Salzsäure zugegeben. Nach dem Erkalten wird 1 ccm der Methylenblaulösung zugesetzt und sodann so viel festes Natriumoxalat, bis Entfärbung eintritt. Wird der Farbstoff nicht entfärbt, so ist Ferroeisen nicht in nennenswerter Menge vorhanden. Tritt Entfärbung ein, so wird mit Methylenblau zu Ende titriert.

Die Methylenblau-Lösung wird in der gleichen Vorrichtung und in der soeben geschilderten Weise mit einer Ferrosalzlösung bekannter Konzentration oder mit Titantrichlorid eingestellt.

## 6. Schnellmethode zum Nachweis des Vitamins C in den Nebennieren.

Durch die Untersuchungen von SZENT-GYÖRGYI<sup>1</sup> ist das Vorkommen der mit dem Vitamin C identischen Ascorbinsäure in der Nebennierenrinde nachgewiesen worden. Auf die stark reduzierenden Eigenschaften dieses Vitamins haben BOURNE<sup>2</sup> und SIEHRS und MILLER<sup>3</sup> einen einfachen Nachweis gegründet. Wir geben die Methode nach SIEHRS und MILLER, die uns die klarsten Resultate zu geben scheint, im folgenden wieder:

Es werden dazu die Nebennieren gelegentlich der Autopsie der im Vitamin-C-Versuch befindlichen Meerschweinchen herausgenommen, durchgeschnitten, in eine neutrale 0,4%ige Silbernitratlösung für 15 Minuten eingelegt und mit einer 115 Watt-Lampe in einer Entfernung von etwa 20 cm (Originalvorschrift 8 inches) belichtet. Es findet sowohl seitens der Rinde als auch der Markschicht eine Reduktion des Silbernitrates statt, doch geht sie in der Marksubstanz wesentlich langsamer vor sich als in der Rinde. Bei gesunden Tieren färben sich die Schnittflächen stark dunkelbraun bis schwarz. Mit der fortschreitenden Vitamin-C-Verarmung der Meerschweinchen nimmt diese Färbung immer mehr ab und schlägt von dem Schwarzbraun allmählich zu einem Rotorange um. Diese Färbung soll bereits nach dem 5. Tag vitamin-C-freier Fütterung auftreten. Nach dem 6. Tag tritt entweder überhaupt keine Reduktion mehr ein oder sie ist so gering, daß sie kaum festzustellen ist. Genaue Nachprüfungen der Methode sind noch notwendig, doch scheint sie erfolgversprechend zu sein.

## 7. Beurteilung des Vitamin-C-Bestandes im menschlichen Körper nach GÖTHLIN.

Zur Beurteilung, ob beim Menschen eine Vitamin-C-Unterernährung besteht, haben GÖTHLIN<sup>4</sup>, GEDDA<sup>5</sup> und FALK, GEDDA und GÖTHLIN<sup>6</sup> eine auf der Resistenz der Hautcapillaren beruhende Methode beschrieben. Es wird dabei so vorgegangen, daß eine Blutdruckmanschette proximal der Ellbogenbeuge angelegt und hierin ein bestimmter Druck erzeugt wird. Dieser Druck wird 15 Minuten lang konstant erhalten. Es kommt dann zum Auftreten von Petechien in der Ellbogenbeuge, deren Zählung etwa 1/2 Stunde nach Absetzen des Druckes in einer kreisförmig abgegrenzten Zone von 3 cm Radius erfolgt. Unter normalen Verhältnissen werden durch einen Druck von 50 mm Hg, der 15 Minuten angehalten hat, nicht mehr als 4 Petechien erzielt. Werden mehr als 8 Petechien erzeugt, so ist der Vitamin-C-Bestand des Körpers deutlich herabgesetzt.

<sup>1</sup> A. SZENT-GYÖRGYI: Biochem. Journ. 1928, **22**, 1387.

<sup>2</sup> G. BOURNE: Nature (Lond.) 1933 I, 874.

<sup>3</sup> A. E. SIEHRS and C. O. MILLER: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 1933, **30**, 696.

<sup>4</sup> G. F. GÖTHLIN: Skand. Arch. Physiol. 1931, **61**, 225; J. Labor. a. clin. Med. 1933, **18**, 484.

<sup>5</sup> K. O. GEDDA: Skand. Arch. Physiol. 1932, **63**, 306.

<sup>6</sup> G. FALK, K. O. GEDDA u. G. F. GÖTHLIN: Skand. Arch. Physiol. 1932, **65**, 24.

### 8. BEZSSONOFFSche Reaktion.

Diese Reaktion hat vor allen Dingen in früheren Jahren eine große Rolle gespielt und sei deshalb hier nochmals angeführt, obwohl alle Untersucher bei kritischer Nachprüfung feststellen mußten, daß die Reaktion nicht spezifisch für Vitamin C ist (JANOWSKAJA<sup>1</sup>, SCHEPILEWSKAJA<sup>2</sup>, v. HAHN und WIEBEN<sup>3</sup>, SALVATORI<sup>4</sup>). Sie ist deshalb für Arbeiten auf diesem Gebiet ungeeignet. Es wird dabei nach einer der letzten Vorschriften (BEZSSONOFF<sup>5</sup>) so vorgegangen, daß 3,6 g Natriumwolframat und 4 g Phosphormolybdänsäure bei etwa 50° in 200 ccm Wasser gelöst werden. Hierzu werden 5 ccm 85%ige Phosphorsäure und unter Umrühren tropfenweise 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Die Lösung wird bei 40—42° innerhalb 20—24 Stunden allmählich auf  $\frac{1}{3}$  eingedunstet. Es scheiden sich blaßgelbe Krystalle aus. Diese werden mehrmals mit 2—3 ccm Wasser rasch gewaschen bis 1 Tropfen des Waschwassers mit Hydrochinon eine blaue, oder mit Pyrogallol braungelbe Färbung gibt (beide Phenole in 0,1%iger Lösung). Von den zwischen Filtrierpapier getrockneten Krystallen werden 15 g in 100 ccm einer 5 Vol.-%igen Schwefelsäure gelöst. In dunklen Flaschen aufbewahrt, hält sich das Reagens mindestens 2 Monate lang. Säfte oder Extrakte des vitamin-C-haltigen Materials soll man mit 5%iger Salzsäure zunächst 5—10 Minuten lang in siedendem Wasserbade erwärmen und hierzu das Reagens geben. Es entsteht eine blaue Färbung, die die Anwesenheit von Vitamin C anzeigen soll.

Wie schon erwähnt, haben diese Angaben bezüglich der Spezifität der Reaktion für Vitamin C bei Nachprüfung nicht Stand gehalten.

## Nachtrag.

Infolge Verzögerung der Drucklegung des vorstehenden Artikels ist ein Zeitraum von mehr als einem Jahr verstrichen, in dem zahlreiche Arbeiten auf dem Vitamingebiet erschienen sind. Dabei sind naturgemäß auch viele methodische Angaben neu gemacht worden, die zwar im allgemeinen die Grundlage des biologischen Vitaminversuches nicht verändern, aber doch in mancher Richtung wertvolle Ergänzungen und Vertiefungen der Kenntnisse gebracht haben. Deshalb sehen wir uns veranlaßt, im folgenden den Benutzern des Handbuches die Möglichkeit zu bieten, sich über diese neueren Errungenschaften kurz zu unterrichten und gegebenenfalls die einschlägige Originalliteratur einzusehen. Es sei auch darauf hingewiesen, daß in der Zwischenzeit ein zusammenfassendes Werk über die Vitaminmethodik von CHR. BOMSKOV<sup>6</sup> erschienen ist, das nicht nur den Nachweis, sondern auch die Darstellung der Vitamine ausführlich behandelt.

### I. Vitamin A.

Besonderes Interesse hat die Weiterentwicklung der quantitativen Bestimmungsmethoden gewonnen, wobei sich der Schwerpunkt auf Durcharbeitung und Verfeinerung der colorimetrischen Bestimmung unter Verwendung der CARR-PRICESchen und anderer Farbreaktionen gelegt hat.

Der Tierversuch hat auch weitere Bearbeitung erfahren, obwohl hier, da er seit Beginn der Vitaminforschung ausgeführt und experimentell gut begründet worden ist, verhältnismäßig nur geringere Neuerungen gemacht worden sind.

#### 1. Tierversuch.

Internationaler Standard. Die im Juni 1934 in London abgehaltene 2. Vitaminkonferenz hat als neues internationales Standardpräparat reines  $\beta$ -Carotin angenommen. Bei gleicher Wirksamkeit wie das frühere Standard-

<sup>1</sup> B. JANOWSKAJA: Arch. Tierern. u. Tierzucht 1931, **6**, 155.

<sup>2</sup> N. E. SCHEPILEWSKAJA: Arch. Tierern. u. Tierzucht 1932, **7**, 279.

<sup>3</sup> F.-V. v. HAHN u. M. WIEBEN: Z. 1932, **63**, 481.

<sup>4</sup> A. SALVATORI: Atti R. Accad. Lincei (Roma), Rend. VI. s., 1932, **16**, 369.

<sup>5</sup> N. BEZSSONOFF: Biochem. Journ. 1923, **17**, 420.

<sup>6</sup> CHR. BOMSKOV: Methodik der Vitaminforschung. Leipzig: Georg Thieme 1935.



präparat ist festgesetzt worden, daß eine internationale Einheit in 0,6  $\gamma$  reinem  $\beta$ -Carotin enthalten ist. 2—4 internationale Einheiten, an vitamin-A-verarmte Ratten verabreicht, stellen das Wachstum wieder her und etwas größere Dosen führen auch Heilung der Xerophthalmie herbei. Die Herstellung und Verteilung ist die gleiche geblieben.

Als Ersatz für das internationale Standard- $\beta$ -Carotin kann auch nach den Beschlüssen der Konferenz ein standardisierter Lebertran benutzt werden, der bisher schon in den Vereinigten Staaten zu gleichen Zwecken Verwendung gefunden hat. Dieses Öl ist besonders für die spektroskopische Bestimmungsmethodik geeignet, und es sind über Verwendung und Vorgehen ausführliche Angaben von der Vitaminkonferenz aufgestellt worden<sup>1</sup>.

Quantitative Bestimmung im Tierversuch. Miß COWARD<sup>2</sup> hat mit ihren Mitarbeitern schon 1930 den Verlauf der Wachstumskurven von Ratten ermittelt, die nach entsprechender vitamin-A-freier Vorbereitung steigende Dosen von Lebertran erhielten. Die Kurven wurden mathematisch berechnet, und es stellte sich bei sorgfältiger Durchführung von Vergleichsversuchen heraus, daß diese Kurven eine gute Grundlage für die Bestimmung des Vitamingehaltes gewähren. Es ist dabei allerdings darauf hinzuweisen, daß diese Kurven nur dann von anderen Laboratorien mit Erfolg gebraucht werden können, wenn sie vorher in diesen Laboratorien erneut festgestellt worden sind, also gewissermaßen eine Eichung stattgefunden hat. COWARD<sup>3</sup> gibt an, daß 10 männliche und 10 weibliche Ratten für je 3 Dosen, z. B. 0,5, 2 und 8 mg eines durchschnittlichen Lebertranks genügen dürften, um die Gültigkeit der Kurven für die Zwecke des betreffenden Laboratoriums zu erhärten und ihren Verlauf festzulegen.

Wie wir früher feststellten<sup>4</sup> (vgl. auch S. 1499), konnte die Steilheit der Wachstumskurven als Mittel der Vitamin-A-Bestimmung nicht als geeignet angesehen werden. Wir wollen damit aber nicht bestreiten, daß bei Vorhandensein eines ganz gleichmäßigen Tiermaterials mit zu Beginn der eigentlichen Testperiode völlig gleichen Vitamin-A-Reserven oder — anders ausgedrückt — völlig gleicher Vitamin-A-Verarmung ein gleichmäßiger Kurvenanstieg bei verschiedenen Dosen möglich ist. Wir halten allerdings die Schwierigkeiten, solche Tiere zu bekommen, für außerordentlich groß. Neuerdings hat auch VAN ESVELD<sup>5</sup> große Schwierigkeiten bei der Ermittlung einer zuverlässigen Carotin-Standardkurve gehabt, so daß ihre alleinige Anwendung infolge großer Abweichungen befriedigende Sicherheit nicht bietet.

Es wird deshalb von allen Autoren immer wieder betont, daß bei quantitativen Untersuchungen gleichzeitig das internationale oder ein anderes, genau bekanntes Standardpräparat zum Vergleich in Kontrollgruppen geprüft wird, wie es auch im Hauptartikel aufgeführt worden ist und schon zur Vermeidung von Saisonschwankungen in der Wirkung unerläßlich ist (COWARD und Mitarbeiter<sup>6</sup>). Nur so ist man vor Täuschungen sicher. Dann aber ist die Genauigkeit durchaus befriedigend, wie unsere eigenen Erfahrungen immer wieder lehren. Nach den Erfahrungen von COWARD<sup>7</sup> werden im biologischen Versuch die gleichen Ergebnisse auch dann erhalten, wenn die zu prüfenden Dosen nicht täglich, sondern in größeren Zwischenräumen (halbwöchentlich) verabreicht werden. Statistische Berechnungen zeigen, daß die Wahrscheinlichkeit übereinstimmender Resultate bei solchem Vorgehen sehr

<sup>1</sup> Report of the second international conference on vitamin standardisation (London June 12th to 14th, 1934). Quarterly Bulletin of the Health Organisation of the League of Nations, Vol. III, Extract Nr. 15. Genf 1934.

<sup>2</sup> K. H. COWARD, K. M. KEY, F. J. DYER u. B. G. E. MORGAN: Biochem. Journ. 1930, 24, 1952.

<sup>3</sup> K. H. COWARD: Biochem. Journ. 1934, 38, 865.

<sup>4</sup> A. SCHEUNERT u. M. SCHIEBLICH: Biochem. Zeitschr. 1933, 263, 444.

<sup>5</sup> L. W. VAN ESVELD: Nederl. Tijdschr. Geneesk. 1934, S. 735. — Acta brev. neerl. Physiol. etc. 1933, 3, 167; Ber. ges. Physiol. 1934, 78, 242 u. 588.

<sup>6</sup> K. H. COWARD, K. M. KEY u. B. G. E. MORGAN: Biochem. Journ. 1933, 27, 873.

<sup>7</sup> K. H. COWARD u. K. M. KEY: Biochem. Journ. 1934, 38, 870.

hoch ist. Mit 77% kann angenommen werden, daß die Resultate innerhalb einer 3% betragenden Fehlergrenze liegen. Wichtig ist ferner, daß die Dauer der eigentlichen Versuchsperiode ausreichend lang gewählt wird. Bei Verwendung einer Gruppe von 10 männlichen Tieren und einwöchiger Versuchsdauer beträgt der wahrscheinliche Fehler noch 44%, sinkt aber bei fünfwöchiger Versuchsdauer auf 15% herab (COWARD<sup>1</sup>). Die für quantitative Versuche verlangte Dauer von 35 Tagen (S. 1497f.) ist deshalb unbedingt einzuhalten. Endlich ist auch auf die Wahl des Lösungsmittels für ölige Vitamin-A- oder Carotinlösungen hinzuweisen. So hat z. B. die Lösung des internationalen Standards in Erdnußöl die 5—6fache Wirksamkeit gegenüber einer Lösung in gehärtetem Baumwollsaatöl und Laurinsäureäthylester. Es müssen also stets dieselben Öle gleicher Herkunft verwendet werden, da auch durch verschiedene Herkunft Schwankungen bedingt werden (DYER, KEY und COWARD<sup>2</sup>). Auch die resorptions-schädigenden Wirkungen von Mineralölen sind gegebenenfalls zu berücksichtigen (DUTCHER, HARRIS, HARTZLER und GUERRANT<sup>3</sup>).

## 2. Antimontrichloridreaktion nach CARR-PRICE.

Die S. 1503 erörterten Schwierigkeiten der CARR-PRICESchen Reaktion haben zu den verschiedensten methodischen Vorschlägen geführt, die einerseits dahin zielen, die auftretende Blaufärbung dauerhafter zu gestalten, andererseits die leicht auftretende Trübung und Emulsionsbildung durch Wassergehalt und ähnliches zu vermeiden. Eine Hauptbedingung ist, daß die Chloroformantimontrichloridlösung immer frisch hergestellt wird, da sie nur geringe Haltbarkeit besitzt. Ebenso ist es nicht möglich, eine Vitamin-A-Chloroformlösung längere Zeit unverändert aufzubewahren. Dies macht sich besonders bei Eichung von Apparaten oder Aufstellung von Standardkurven sehr störend bemerkbar. Die Schwierigkeiten häufen sich, sobald man tierische oder pflanzliche Gewebe, die extrahiert oder verseift werden müssen, der Untersuchung unterwirft, da dann noch andere Chromogene mit ähnlichen Absorptionsspektren auftreten. GOLDHAMMER und KUEN<sup>4</sup> haben hierüber neue Befunde beigebracht.

Zur Vergleichs-colorimetrie ist das LOVIBOND-Colorimeter mit seiner konstanten Farbskala am bequemsten. Hierbei macht vor allem die Vergleichslösung Schwierigkeiten. BROCKMANN und TECKLENBURG<sup>5</sup> empfehlen Kupfersulfatlösungen, denen eine bestimmte Menge Kobaltnitrat zugesetzt ist. So hat eine Lösung von 5 g  $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$  und 0,125 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  in 50 ccm Wasser im LOVIBOND-Tintometer 6,2 blau und 2,0 gelb als Farbwerte. Diese Autoren haben eine Serie derartiger Vergleichslösungen in zugeschmolzenen Reagenzgläsern hergestellt und mit einem LOVIBOND-Colorimeter geeicht. Eichung ist auf jeden Fall auch nach unseren Erfahrungen notwendig. Ohne Vergleichslösung kann man mit dem Pulfrich-Zeisschen Stufenphotometer, und zwar mit dem Filter S 61, arbeiten; allerdings nur auf der Grundlage einer sorgfältig aufgestellten Eichungskurve, die man mit einem genau bekannten Vitamin-A-Präparat ermittelt hat.

Zur Vermeidung der leicht auftretenden Trübungen, Emulsionsbildung und sonstigen Störungen werden verschiedene Hilfsmittel empfohlen. SAPEGNO<sup>6</sup> schlägt als Lösungsmittel statt Chloroform Eisessig vor, der sich besonders für Carotinbestimmungen eignen

<sup>1</sup> K. H. COWARD: *Biochem. Journ.* 1933, **27**, 445.

<sup>2</sup> F. J. DYER, K. M. KEY u. K. H. COWARD: *Biochem. Journ.* 1934, **38**, 875.

<sup>3</sup> R. A. DUTCHER, P. L. HARRIS, E. R. HARTZLER u. N. B. GUERRANT: *Journ. Nutrit.* 1934, **8**, 269.

<sup>4</sup> H. GOLDHAMMER u. F. M. KUEN: *Biochem. Zeitschr.* 1933, **267**, 406, 417.

<sup>5</sup> H. BROCKMANN u. M.-L. TECKLENBURG: *Zeitschr. physiol. Chem.* 1933, **221**, 117.

<sup>6</sup> E. SAPEGNO: *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 1933, **8**, 794; *Ber. ges. Physiol.* 1934, **76**, 276.

soll. DAVIES<sup>1</sup> hat die ursprüngliche Extraktionsmethode von ROSENHEIM und WEBSTER<sup>2</sup> und MOORE<sup>3</sup> nach Verseifung von tierischen Geweben vereinfacht. Alle diese Modifikationen bedürfen vor endgültiger Anwendung sorgfältiger Prüfung und Einarbeitung auf dieselben.

#### Modifikationen nach ROSENTHAL und ERDÉLYI<sup>4</sup> mit Brenzcatechin und Guajacol.

Nach Verdünnung des zu untersuchenden Öles (Lebertran, Vogan) mit Chloroform wird 1 ccm einer 0,5%igen Brenzcatechinelösung in Chloroform zugefügt und hierauf 2—3 ccm der kaltgesättigten  $\text{SbCl}_3$ -Chloroformlösung nach CARR-PRICE zugegeben. Das Gemisch wird sogleich 1—2 Minuten im Wasserbad auf 60° erwärmt, wobei die zu Anfang entstandene Blaureaktion in Violetrot übergeht. In der Kälte entsteht die Reaktion nicht. Die Methode eignet sich auch zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung.

Die gleiche Reaktion entsteht auch mit Hydrochinol, Guajacol und anderen Polyphenolen. Am besten soll sich für quantitative Bestimmungen das Guajacol, und zwar in 5%iger Lösung (5 g Guajacol in 100 ccm trockenem reinem Chloroform) eignen. Die Farbe dieser Reaktion, für die sich eine 0,01%ige  $\text{KMnO}_4$ -Lösung als Vergleichslösung empfiehlt, ist sehr beständig. Die Verfasser geben an, mit dem LEITZschen Absolutcolorimeter der „grauen Lösung“ und dem Spezialfilter Nr. 7 bei monochromatischem Licht genaue Ergebnisse erhalten zu haben. Diese Methoden könnten über die bestehenden Schwierigkeiten der CARR-PRICEschen Methodik hinweghelfen, erfordern aber noch Durcharbeitung.

### 3. Spektroskopische Methoden.

Es hat sich immer deutlicher herausgestellt, daß die Absorption des Vitamin A bei 328  $m\mu$  sehr gut zur quantitativen Messung Verwendung finden kann. Auch die Internationale Standardisierungskommission (S. 1544) hat sich auf Grund der vorliegenden Arbeiten dahingehend entschieden, die Messung des Absorptionskoeffizienten ( $E$ ) bei 328  $m\mu$  als zuverlässige Methode zur Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes von Leberölen und Konzentraten anzuerkennen. Um die für  $E_{1\text{ ccm}}^{1\%}$  328  $m\mu$  gefundenen Werte in internationale Vitamin-A-Einheiten umzurechnen, wird der Faktor 1600 empfohlen.

Die vorgeschriebene Methode verläuft wie folgt: Die Messung muß im Unverseifbaren ausgeführt werden, wenn nicht das Material einen höheren Gehalt als 10000 internationale Einheiten im Gramm aufweist. Da der Fehler, der bei der Verseifung gemacht werden könnte, möglicherweise stören würde, wird folgendes einheitliche Vorgehen empfohlen: 1 g des zu untersuchenden Öles wird mit 10 ccm frisch hergestellter alkoholischer 0,5 N.-Kalilauge derart verseift, daß so lange gekocht wird, bis die Lösung klar erscheint (Dauer ungefähr 5 Minuten). Nach Zugabe von 20 ccm Wasser wird in einem kleinen Scheidetrichter zweimal mit 25 ccm peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte werden zuerst mit 10—20 ccm Wasser, dann mit 20 ccm 0,5 N.-Kalilauge und dann wieder mit Wasser gewaschen, wobei der Trichter unter Vermeidung von Schütteln sanft geschwenkt wird. Die ätherische Lösung wird dann zweimal mit je 10 ccm Wasser gründlich ausgeschüttelt und in einen Kolben filtriert. Der Äther wird bis zur Trockne verdampft und der Rest in Äthylalkohol oder Cyclohexan gelöst und hierauf so weit eingeengt, wie es das gebrauchte Spektrophotometer erfordert. Ein Vorversuch mit dem rohen Öl gibt Hinweise auf die zu verwendende Menge von Öl und Lösungsmittel.

Reiner Äthylalkohol oder Cyclohexan müssen als Lösungsmittel verwendet werden. Reines Cyclohexan, das für spektrographische Untersuchungen geeignet ist, muß die folgenden Konstanten besitzen:  $d_{40}^{20} = 0,7784$ ; Siedepunkt 81,4°; Schmelzpunkt 6,5°. Das

<sup>1</sup> A. W. DAVIES: Biochem. Journ. 1933, 27, 1770.

<sup>2</sup> O. ROSENHEIM u. TH. A. WEBSTER: Biochem. Journ. 1927, 21, 111.

<sup>3</sup> TH. MOORE: Biochem. Journ. 1930, 24, 692.

<sup>4</sup> E. ROSENTHAL u. J. ERDÉLYI: Biochem. Zeitschr. 1933, 267, 119; 1934, 271, 414. — Biochem. Journ. 1934, 28, 41. — Magy. orv. Arch. 1934, 35, 232; Ber. ges. Physiol. 1934, 80, 433.

Spektrum muß im Gebiet von 328 m $\mu$  absolut klar sein und darf keine Spur von Absorption aufweisen. Die Intensität der Absorption bei 328 m $\mu$  kann mit  $\pm 2\frac{1}{2}\%$  durch geeignete spektrophotometrische Methoden dargestellt werden. Der Faktor 1600 ist ein Mittelwert, der bei vergleichenden Prüfungen der unverseifbaren Fraktion von Lebertran und hohen Vitaminkonzentraten gewonnen worden ist. Falls der Gehalt des Präparates in internationalen Einheiten mit dieser Methode festgestellt wird, ist dies anzuführen.

## II. Vitamin D.

### 1. Allgemeine Versuchsbedingungen.

Der S. 1506 unter „Fütterung“ erwähnte geringe Vitamin-D-Gehalt des Mais, der die Wirkung der rachitogenen Kostform unsicher zu gestalten vermag, machte sich neuerdings mehrfach bei Versuchen störend bemerkbar. HARRIS und BUNKER<sup>1</sup> empfehlen, den Mais vor der Verwendung mindestens 6 Monate in gemahlenem Zustand aufzubewahren, da dann die erzeugte Rachitis gleichmäßiger und schwerer ist. Auch der Phosphorgehalt des Mais weist nach diesen Autoren so große Schwankungen auf, daß er bei Verwendung der STEENBOCK-BLACK-Kost zur Unterdrückung der rachitogenen Wirkung führen kann. Es muß deshalb der zu verwendende Mais auf Vitamin D und auch auf seinen Gehalt an Phosphor geprüft werden. Auch BRUCE und CALLOW<sup>2</sup> empfehlen bei Verwendung von Cerealien in rachitiserzeugenden Kostsätzen die Bestimmung von Gesamtphosphor und auch von Phytinphosphor. Bei der Lagerung der rachitogenen Kost können sich die Verhältnisse von Gesamtphosphor zu Phytinphosphor und damit die rachitogenen Eigenschaften der Kost ändern. Wie groß die durch Anwendung verschiedener Getreidearten in der rachitogenen Kost erforderlichen Vitamin-D-Mengen sein können, wurde beim Vergleich von Weizen und Buchweizen als Grundlage der McCOLLUM-Kost Nr. 3143 von SCHIEBLICH<sup>3</sup> gezeigt. Die rachitiserzeugende Wirkung dieser Kostform wurde durch die Verwendung von Buchweizen und die damit verbundene Erniedrigung ihres Phosphorgehaltes wesentlich verstärkt. Es ist deshalb unbedingt notwendig, auf die Qualität der verwendeten Getreidearten zu achten und nicht zulässig, Versuche, die mit Getreide verschiedener Herkunft oder gar Sorte ausgeführt worden sind, miteinander zu vergleichen.

### 2. Internationale Standardlösung.

Während die bisherige internationale Standardlösung aus einem Ultraviolettbestrahlungsprodukt von Ergosterin hergestellt worden war, das neben Vitamin D auch noch andere Bestrahlungsprodukte enthielt, wird nunmehr eine neue Lösung gleicher Stärke als internationale Standardlösung in Aussicht genommen, die reines krystallisiertes Vitamin D in Olivenöl gelöst enthält. 1 mg dieser Lösung enthält 0,025  $\gamma$  krystallisiertes Vitamin D, liegt also über der Schutzdosis, die WINDAUS und Mitarbeiter<sup>4</sup> mit 0,02 bzw. 0,015  $\gamma$  für das reine Vitamin D seinerzeit angegeben hatten. Die Definition, daß 1 mg der Standardlösung einer internationalen Einheit entspricht, bleibt bestehen.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die Konferenz die allgemeine Verwendung von genau bekannten Lebertranproben als behelfsmäßigen Standard nicht empfohlen hat, da sie vor allem im Hinblick auf die Lagerungsfrage dies für unzumutbar hielt. Jedoch hält sie trotzdem die Verwendung von Lebertran-Standardlösungen für die speziellen Zwecke eines Landes für angängig, empfiehlt aber, dann trotzdem den Gehalt der geprüften Präparate in internationalen Einheiten auszudrücken.

<sup>1</sup> R. S. HARRIS u. J. W. M. BUNKER: Journ. Lab. clin. Med. 1934, 19, 390.

<sup>2</sup> H. M. BRUCE u. R. K. CALLOW: Biochem. Journ. 1934, 28, 517.

<sup>3</sup> M. SCHIEBLICH: Biochem. Zeitschr. 1933, 265, 1.

<sup>4</sup> A. WINDAUS, O. LINSERT, A. LÜTTRINGHAUS u. G. WEIDLICH: Liebigs Ann. 1932, 492, 226.

### III. Vitamin E.

Auf Grund der Erfahrungen im Laboratorium von GRIJNS (Wageningen) beschrieb SCHOORL<sup>1</sup> eine neue Diät. Diese ist zusammengesetzt aus:

|                               |     |                              |    |
|-------------------------------|-----|------------------------------|----|
| Casein (technisch) . . . . .  | 60  | Lebertran . . . . .          | 2  |
| Kartoffelstärke . . . . .     | 100 | Butterfett . . . . .         | 13 |
| Dextrin (technisch) . . . . . | 130 | Salzgemisch McCOLLUM Nr. 185 | 15 |
| Bierhefe . . . . .            | 20  |                              |    |

Die Kost soll Sterilität weiblicher Ratten mit großer Sicherheit gewährleisten. Männliche Tiere bleiben länger zeugungsfähig.

### IV. Vitamine der B-Gruppe.

#### A. Vitamin B<sub>1</sub>.

##### 1. Rattenversuch.

Wie schon S. 1520 vermerkt wurde, ist unter Umständen die Zugabe eines reinen Vitamin-B<sub>4</sub>-Präparates zur Sicherung der Vitaminbedürfnisse der Versuchstiere unbedingt erforderlich. Dies ist auch in den letzten Jahren immer deutlicher geworden. Die Herstellung dieser Präparate ist sehr langwierig und erfordert die Benutzung der Originalvorschriften von BARNES und Mitarbeitern (vgl. S. 1520), sowie KINNERSLEY und Mitarbeitern<sup>2</sup>.

Zur Vitamin-B<sub>2</sub>-Versorgung empfehlen BENDER und Mitarbeiter<sup>3</sup> 2 Stunden bei 120° autoklavierte Trockenmolken. Die Untersuchungen sollen durch Verwendung solcher Präparate, die, da sie käuflich nicht zu erwerben sind, naturgemäß immer erst Herstellung im Laboratorium und Prüfung im Rattenversuch bei gänzlich vitamin-B-freier Nahrung erfordern, sicherere Resultate ergeben, als mit autoklavierter Hefe. Wir sind im üblichen Testversuch bisher im allgemeinen mit autoklavierter Hefe ausgekommen, obwohl gelegentlich Störungen des Versuchsverlaufes, die wir auf Vitamin-B<sub>4</sub>-Mangel zurückführen möchten, beobachtet werden.

Bei Untersuchung von Getreidearten hat MITCHELL<sup>4</sup> eine neue Modifikation des Vitamin-B<sub>1</sub>-Versuches empfohlen. Die 4 Wochen alten Ratten werden auf einer Grundkost von 18% Casein, 10% Zucker, 50% Stärke, 10% filtriertem Butterfett, 5% autoklavierter Hefe, 2% Lebertran, 1% Kochsalz und 4% Salzgemisch nach OSBORNE und MENDEL so lange gehalten, bis sie keine Gewichtszunahme mehr zeigen. Dann werden sie nach Paaren geordnet, wobei nur Tiere gleichen Wurfes, Alters, Geschlechts und Gewichts herangezogen werden. Das zu prüfende Material wird als Ersatz der Stärke in Mengen von 35, 40 und 45% der Grundkost zugesetzt und jeder Ratte die gleiche Menge der Versuchskost vorgelegt. Von jedem Paar bekommt außerdem ein Tier noch eine voll genügende Menge eines konzentrierten Vitamin-B<sub>1</sub>-Präparates. Ergibt sich zwischen den Ratten eines Paares keine Gewichts-differenz, so enthält die zu prüfende Getreidezulage ausreichend Vitamin B<sub>1</sub>, ist eine Gewichts-differenz vorhanden, so genügt die Menge nicht. Auch der Eiweißgehalt der Kost kann nach diesem Autor die Resultate beeinflussen.

a) Methode von SCHEUNERT und SCHIEBLICH. Wir haben den in unserem Laboratorium üblichen Rattenversuch für den Vitamin-B<sub>1</sub>-Nachweis weiterhin durchgearbeitet, wobei sich die folgende, auch für quantitative Zwecke geeignete

<sup>1</sup> P. SCHOORL: Arch. néerl. Physiol. 1934, 19, 403.

<sup>2</sup> H. W. KINNERSLEY, J. R. O'BRIEN, R. A. PETERS u. V. READER: Biochem. Journ. 1933, 27, 225.

<sup>3</sup> R. C. BENDER, G. E. FLANIGAN u. G. C. SUPPLEE: Journ. Nutrit. 1934, 8, 357.

<sup>4</sup> H. H. MITCHELL: Amer. Journ. Physiol. 1933, 104, 594.

Methode als recht sicher erwiesen hat. Die Ratten werden, wie S. 1521 ausgeführt, vorbereitet, wobei als Kost unsere S. 1520 angeführte modifizierte Kostform nach CHICK und ROSCOE verwendet wird. Es werden stets Gruppen von 10 Ratten im Anfangsgewicht von je 55—60 g in den Versuch genommen. Haben die Ratten mehrere Tage deutliche Gewichtsabnahmen gezeigt, was nach etwas verschiedener Dauer der Vorfütterung eintritt, so erfolgt die Zulage der zu prüfenden Substanz, deren Höhe für jede Gruppe verschieden groß gewählt wird. Die Versuchsdauer beträgt 35 Tage. Es wird diejenige Dosis ermittelt, die gerade genügt, um 8 Ratten von 10 die Versuchsperiode durchlaufen zu lassen und die Bedingungen des Versuches zu erfüllen. Diese Bedingungen sind: Die Ratten müssen sich zum mindesten auf ihrem Gewicht halten, wobei eine Abnahme bis zu höchstens 2 g gegenüber dem Gewicht am ersten Zulagetag noch als Erhaltung des Gewichts gilt. Tiere mit größeren Abnahmen gelten als negativ. Zunahmen sind zulässig. Als negativ gelten Ratten, die während des Versuchsverlaufes polyneuritische Krämpfe zeigen oder sterben. Als Beispiel sei die Auswertung eines Versuches über den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt getrockneter Bierhefe gegeben, wie wir sie tabellarisch geordnet darzustellen pflegen.

Bierhefe, getrocknet.

| Tagesdosis je Ratte g | Anzahl der Ratten | Genügend | Ungenügend                   |         |                 |     |
|-----------------------|-------------------|----------|------------------------------|---------|-----------------|-----|
|                       |                   |          | Gewichtsabnahme mehr als 2 g | Krämpfe | Krämpfe und tot | tot |
| 0,01                  | 10                | 10       | —                            | —       | —               | —   |
| 0,005                 | 10                | 5        | 3                            | —       | 1               | 1   |

Die gesuchte Grenzdosierung lag bei 0,01 g.

Die Methode hat bei zahlreichen Versuchen beim Vergleich verschiedener Trockenhefen und anderer Materialien zu recht befriedigenden Ergebnissen geführt. Sie eignet sich auch sehr gut zur Auswertung des internationalen Standardpräparates.

b. Internationales Standardpräparat. Die 2. Internationale Vitamin-konferenz hat das bisherige Standardpräparat beibehalten. Nach RANDOIN<sup>1</sup> enthält dieses übrigens neben dem Vitamin B<sub>1</sub> noch andere Vitamine der B-Gruppe (B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>). Wir möchten annehmen, daß auch Vitamin B<sub>4</sub> darin enthalten ist.

## 2. Taubenversuch.

Die S. 1525 beschriebene Heilmethode nach KINNERSLEY, PETERS und READER ist von verschiedenen Autoren als sehr brauchbar immer wieder erhärtet worden. SCHULTZ und LAQUER<sup>2</sup> machen auf einige Vorsichtsmaßnahmen aufmerksam, die sorgfältig beobachtet werden müssen, um sichere Ergebnisse zu erzielen. Wichtig ist vor allem die Temperaturfrage. Niedrige Temperaturen und Witterungsumschläge befördern das Auftreten der Krämpfe. Solche Tiere, in warme Räume verbracht, können scheinbar wiederhergestellt werden, wobei die Krämpfe verschwinden. Nach einiger Zeit tritt aber stets dann auch im warmen Raum ein neuer Krampfanfall ein, der nunmehr bestehen bleibt. In diesem Stadium sind die Tiere zum Versuch geeignet. Die genannten Autoren verwenden nur solche Tiere, die erstens die rein spastische Form der Beriberi zeigen und zweitens bei der Temperatur des Versuchsraumes mehrere Stunden ununterbrochen im Krampfzustand verweilen. Es werden von ihnen nur die Versuche anerkannt, bei denen die Heilung innerhalb 3—6 Stunden eintritt und bei denen sie mindestens 36 Stunden einwandfrei anhält. Als besonders wichtig

<sup>1</sup> L. RANDOIN: Bull. Soc. Chim. biol. Paris 1934, 16, 440.

<sup>2</sup> F. SCHULTZ u. F. LAQUER: Zeitschr. physiol. Chem. 1933, 219, 158.

zur Vermeidung von Täuschungen wird vorgeschrieben, daß nach Eintreten der anscheinenden Heilung der Kopf der betreffenden Taube einige Male nach rückwärts in die Lage zu biegen ist, die er im Opisthotonus innehatte. Liegt keine spezifische Heilung vor oder war die angewandte Dosis zu gering, so wird auf diese Weise wenigstens vorübergehend ein erneuter Krampfzustand ausgelöst. Dieser Zustand wird als Pseudoheilung bezeichnet. War diese Behandlung ohne Einfluß, so wird das Tier mehrere Male im Kreise geschwenkt. Tritt auch dann kein neuer Krampfzustand ein, so kann man fast mit Sicherheit von echter Heilung sprechen. Um jeder Täuschungsmöglichkeit vorzubeugen, soll die Probe mindestens an 6 Tieren geprüft werden. Dann werden auch die ganz vereinzelt Fälle, in denen trotz positiven Ausfalls der Proben dennoch Pseudoheilung bestand, erkannt und können ausgeschaltet werden.

COWARD und Mitarbeiter<sup>1</sup> haben zur Auswertung des Taubenversuches den Quotienten aus der Anzahl der Tage der Heilungsdauer und dem Gewicht des verwendeten Präparates (bei einmaliger Gabe) ermittelt und damit gute Erfolge erzielt.

### 3. Andere Methoden, Farbreaktionen.

Von SPRUYT<sup>2</sup> ist zum Zwecke der Prüfung von Reis eine colorimetrische und eine chemische Methode ausgearbeitet worden. Die Methoden haben bisher eine weitere Verbreitung nicht gefunden, können aber, da mit ihrer Hilfe zahlreiche Proben von Reis untersucht werden können, Bedeutung gewinnen. Abgesehen davon, daß sie an sich noch weiterer Bestätigung bedürfen, müssen sie zur Anwendung auf andere Materialien zunächst für diese geprüft werden. Die colorimetrische Methode wurde von indischen Autoren (ACTON und Mitarbeiter<sup>3</sup>) zum Vergleich des Vitamingehaltes von verschiedenen vorbereiteten Reissorten verwendet und zeigte je nach der Behandlungsweise des Reises Unterschiede. Die Methoden können eventuell praktische Bedeutung gewinnen. Deshalb sei hier auf sie verwiesen.

Eine weitere Farbreaktion haben für kristallisierte Vitamin-B<sub>1</sub>-Präparate KINNERSLEY und PETERS<sup>4</sup> unter dem Namen Formaldehyddiazoreaktion beschrieben. 0,5 ccm diazotierte Sulfanilsäure (KOESSLER und HANKE<sup>5</sup>) wird mit 1,25 ccm einer spezifischen Reagenslösung in einem kleinen Reagensglas versetzt. Die Reagenslösung ist wie folgt zusammengesetzt:

|             |                   |         |
|-------------|-------------------|---------|
| Natronlauge | Natriumbicarbonat | Wasser  |
| 100 ccm     | 5,76 g            | 100 ccm |

Nach 1 Minute wird ein Tropfen (0,03 ccm) 40%iger Formaldehydlösung hinzugefügt und darauf unmittelbar das Vitaminkonzentrat in 0,1—0,3 ccm einer Lösung von einem p<sub>H</sub>, der größer als 4 ist, zugesetzt. Es tritt eine blaßrote Farbe auf, die in ihrer Intensität während 30—60 Minuten zunimmt. Nach dieser Zeit bleibt sie nahezu konstant. Es wird ein Vergleich mit bekannten Vitaminlösungen empfohlen. Die Verwendung eines Colorimeters hat sich dabei nicht bewährt.

## B. Vitamin B<sub>2</sub>.

Im Verfolg der weiteren Unterteilung der Vitamine ist die Frage aufgeworfen worden, ob die bisher dem Vitamin B<sub>2</sub> zugeschriebenen Wirkungen nicht verschiedenen Vitaminen zuzusprechen sind. Insbesondere hat man, abgesehen von anderen Möglichkeiten, in Erwägung gezogen, ob nicht in dem Vitamin B<sub>2</sub> ein Wachstums-Vitamin und ein Antidermatitis-Vitamin enthalten seien. Die Fragen sind zur Zeit keineswegs schon so weit geklärt, daß sie bei Vitaminuntersuchungen für praktische Zwecke, insbesondere der Lebensmittelchemie, größere Bedeutung besitzen. ROSCOE<sup>6</sup> neigt zur Annahme, daß die dermatitisheilende und die Wachstumswirkung von denselben Substanzen hervorgerufen würden

<sup>1</sup> K. H. COWARD, J. H. BURN, H. W. LING u. B. G. E. MORGAN: *Biochem. Journ.* 1933, **27**, 1719.

<sup>2</sup> J. P. SPRUYT: *Meded. Dienst Volksgezdh. Nederl.-Indië* 1930, **19**, 46; *Ber. ges. Physiol.* 1931, **58**, 286. — *Diss. Amsterdam* 1933, S. 177 u. englische Zus.-Fassung; *Ber. ges. Physiol.* 1934, **76**, 461.

<sup>3</sup> H. W. ACTON, S. GHOSH u. A. DUTT: *Indian Journ. med. Res.* 1933, **21**, 103.

<sup>4</sup> H. W. KINNERSLEY u. R. A. PETERS: *Biochem. Journ.* 1934, **28**, 667.

<sup>5</sup> K. K. KOESSLER u. M. T. HANKE: *Journ. Biol. Chem.* 1919, **39**, 505.

<sup>6</sup> H. M. ROSCOE: *Biochem. Journ.* 1933, **27**, 1533, 1537, 1540.

und nur quantitative Unterschiede beständen. Nach den Untersuchungen von GYÖRGY<sup>1</sup> dürfte aber doch eine Verschiedenheit vorliegen.

Nach GYÖRGY und Mitarbeitern<sup>2</sup> gehört das Vitamin B<sub>2</sub> zu einer neu entdeckten Gruppe von Farbstoffen, die als Flavine bezeichnet werden. Zum Nachweis im Tierversuch eignet sich die Kost und Methode von SHERMAN und BOURQUIN, die S. 1527 beschrieben worden ist. Es muß darauf geachtet werden, daß auch hier, wie beim Vitamin-B<sub>1</sub>-Versuch, die Zufuhr von Vitamin B<sub>4</sub> (vgl. hierzu GYÖRGY und Mitarbeiter<sup>3</sup>) gesichert ist. Gegebenenfalls muß dann ein Vitamin-B<sub>4</sub>-Präparat (KINNERSLEY und Mitarbeiter, S. 1548) zugegeben werden. Nach diesen Untersuchungen erfolgt das Auftreten einer Dermatitis unabhängig von der Zugabe von Vitamin B<sub>2</sub> oder reinem Flavin. Es muß danach eine Verschiedenheit des Antidermatitisfaktors vom Vitamin B<sub>2</sub> oder dem reinen Flavin angenommen werden.

a) Dermatitis erzeugende Kost nach GYÖRGY<sup>1</sup>. Es gelingt regelmäßig, die bei Pellagra typischen Hauterkrankungen hervorzurufen, wenn man Ratten mit einer Kost aus:

| Casein (Glaxo) | Reisstärke | Butterfett | Lebertran | Salzgemisch |
|----------------|------------|------------|-----------|-------------|
| 18             | 68         | 9          | 1         | 4%          |

füttert. Als Vitamin B<sub>1</sub> ist dabei ein reines Konzentrat (4—6 Taubeneinheiten) und als Vitamin B<sub>2</sub> täglich 10  $\gamma$  reines Flavin zuzugeben. Das Antidermatitis-Vitamin wird vorläufig als Vitamin B<sub>6</sub> bezeichnet.

b) Fluorescenzmethode. Nach den Untersuchungen von KUHN und Mitarbeitern<sup>4</sup> zeigen die Flavine und damit auch das Vitamin B<sub>2</sub> hochgradige Fluorescenz. Neuerdings sind die ersten Ansätze dazu gemacht worden, diese Eigenschaft zu einer Nachweismethode zu verwenden. Vorerst ist die Reaktion aber noch zu unspezifisch, um eine praktische Bedeutung gewinnen zu können. Vielleicht bestehen aber für die Zukunft hier gut auswertbare Möglichkeiten (JOSEPHY<sup>5</sup>, COHEN<sup>5</sup>).

c) Lumiflavinmethode. Die weitere Beobachtung, daß die Flavine bei Bestrahlung mit einer starken elektrischen Lampe in grüngelb gefärbte neue Farbstoffe, sog. Lumiflavine, übergehen, ist ebenfalls zur methodischen Verwertung herangezogen worden. Die Lumiflavine lassen sich nach dem Ansäuern der Lösung mit Chloroform ausschütteln und können dann colorimetrisch im Stufenphotometer bestimmt werden. Auch dieses Vorgehen ist vielleicht für die Zukunft erfolgversprechend. Vorläufig sind diese Methoden durch andere fluoreszierende Begleitsubstanzen leicht Irrtümern unterworfen (WAGNER-JAUREGG<sup>6</sup>).

## V. Vitamin C.

### 1. Allgemeine Versuchsbedingungen.

Eine einfache Versuchskost, die von Meerschweinchen gern gefressen wird und somit Zwangsfütterung vermeiden läßt, gibt DEMOLE<sup>7</sup> an. 2 kg Haferflocken, 1 kg gezuckertes Trockenmilchpulver und 6 Eiereiweiße werden mit Wasser zu einem festen Teig verarbeitet. Hieraus werden kleine dicke Kuchen mit 5 cm Durchmesser geformt und auf einem mit Olivenöl schwach eingefetteten Blech 20—25 Minuten gebacken. Auf der Oberfläche bildet sich eine braune Kruste, die für die Nagetiere angenehm ist. Kühl gelagert halten sich die Kuchen 2—3 Wochen. Wenn sie ausgetrocknet sind, können sie mit Wasser aufgeweicht werden. Das aus dem Handel bezogene Trockenmilchpulver wird in dünner Schicht im Trockensterilisator auf 120° erhitzt, wobei leichtes Braunwerden nicht schadet. Die Erhitzung kann auch im Autoklaven bei 110° über 2—3 Stunden ausgeführt werden. Es wird

<sup>1</sup> P. GYÖRGY: Nature (Lond.) 1934 I, 498.

<sup>2</sup> P. GYÖRGY, R. KUHN u. TH. WAGNER-JAUREGG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1933, 66, 317, 676, 1034, 1577; Naturwiss. 1933, 21, 560; Klin. Wchschr. 1933, 12, 1241; Zeitschr. physiol. Chem. 1934, 223, 21, 27, 241.

<sup>3</sup> P. GYÖRGY, F. W. VAN KLAVEREN, R. KUHN u. TH. WAGNER-JAUREGG: Zeitschr. physiol. Chem. 1934, 223, 236.

<sup>4</sup> R. KUHN, P. GYÖRGY u. TH. WAGNER-JAUREGG: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1933, 66, 317.

<sup>5</sup> B. JOSEPHY: Nederl. Tijdschr. Geneesk. 1934, 2667. — Acta brev. neerl. Physiol. etc. 1934, 4, 46. — Ber. ges. Physiol. 1934, 81, 616, 617.

<sup>6</sup> TH. WAGNER-JAUREGG: Angew. Chem. 1934, 47, 318.

<sup>7</sup> V. DEMOLE: Zeitschr. Vitaminforsch. 1934, 3, 89.



empfohlen, die Tiere in Gruppen von 10—20 Tieren zu halten und ihnen genügend Wasser und ein dickes Heulager, von dem sie auch fressen können, zur Verfügung zu stellen. Zweimal wöchentlich werden die Käfige gereinigt und den Tieren mit der Pipette 0,1—0,2 ccm Lebertran gegeben. Die Tiere nehmen schon nach 10—16 Tagen an Gewicht ab und sind dann für den Heilversuch geeignet.

## 2. Quantitativer Nachweis.

Die S. 1535 kurz erwähnte Methode von KEY und ELPHICK gestattet nach den Untersuchungen von MOLL<sup>1</sup> nur bei größerer Erfahrung und Verwendung vieler Versuchstiere eine quantitative Auswertung der Befunde. MOLL, der hierüber die größten Erfahrungen besitzt, verwendet als Mangeldiät die Diät von SHERMAN, LA MER und CAMPBELL (vgl. S. 1529) bei Versuchstieren im Alter von 6—8 Wochen und im Gewicht von 300—350 g. Die skorbutanzeigenden charakteristischen Zahnveränderungen treten schon sehr frühzeitig auf (vgl. S. 1534 und auch bei MOLL). Bei der Durchführung des Versuches wird der Todestag der unbehandelten Kontrollen abgewartet, der im Durchschnitt etwa am 27. Tag erfolgt. Die behandelten Tiere werden etwa gleichzeitig, nachdem die Kontrollen eingegangen sind, getötet und nunmehr die Schutzwirkung unter Berücksichtigung des Sektionsbefundes, des Verlaufes der Gewichtskurven und der nach dem Schema von KEY und ELPHICK (S. 1535 und MOLL<sup>1</sup>) gefundenen Veränderungen an den Schneidezahnwurzeln beurteilt. Beim Sektionsbefund werden die Skorbuterscheinungen in schwer, mittel, leicht und fehlend eingeteilt. Bei Berücksichtigung der Gesamtheit der Befunde ergibt sich dann ein klares Bild, wobei sich die quantitative Auswertung besonders auf den Zahnbefund stützt. Das Vorgehen von MOLL, das im Forschungslaboratorium der Firma E. Merck, Darmstadt ausgearbeitet worden ist, erfordert Einübung und ist infolge der vorzunehmenden histologischen Untersuchungen nur unter Einsichtnahme in die Originalliteratur durchzuführen.

Für reine Ascorbinsäure haben die Untersuchungen von MOLL bei dieser Methode ergeben, daß 0,25 mg täglich die Lebensdauer vitamin-C-frei ernährter Meerschweinchen um mehr als das Doppelte verlängern. 0,5 mg erhalten die Tiere am Leben, jedoch besteht nach der Wachstumskurve eine Störung des Wachstums. 1 mg täglich sichert für 90 Tage optimales Wachstum, doch sind trotzdem noch gewisse pathologische Zahnveränderungen vorhanden. Erst 1,5—2 mg sind als minimale Schutzdosis zu bezeichnen.

## 3. TILLMANSSCHE Methode.

Für die TILLMANSSCHE Methode werden verschiedene Verbesserungen und Abänderungen vorgeschlagen, die sie zu verschiedenen Zwecken geeignet machen. Die experimentellen Schwierigkeiten, die die Eichung der Indicatorlösung mit Hilfe von Ferroammoniumsulfat erfordert, haben zur Suche nach Ersatzmethoden geführt. Hierzu ist besonders die Titration einer reinen Vitamin-C-Lösung gegen Jod empfohlen worden. HARRIS und RAY<sup>2</sup> stellten fest, daß reine Ascorbinsäurelösungen mit großer Genauigkeit gegen Jodlösung titriert werden können, wobei 1 Molekül Ascorbinsäure 2 Atome Jod reduziert. Es gelingt auf diese Weise leicht, auch den Phenolindophenolindicator auf reine Ascorbinsäure umzurechnen.

BESSÉ und KING<sup>3</sup> benutzen frisch hergestellten filtrierten Citronensaft. 5 ccm werden davon mit 0,01 N.-Jodlösung, die pro Liter 15 g Kaliumjodid enthält, bis zur bleibenden Blaufärbung des Stärkeindicators titriert. 1 ccm 0,01 N.-Jodlösung entspricht 0,88 mg Vitamin C. Eine weitere Portion von 5 ccm desselben Saftes wird dann mit 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung titriert, bis bleibende Rötlichfärbung besteht. Damit kann man den Vitamin-C-Wert der Phenolindophenol-Lösung feststellen. Apfelsinensaft oder andere Pflanzensäfte sind nicht brauchbar, da man dabei einen zu hohen Jodverbrauch erhält.

<sup>1</sup> TH. MOLL: Mercks Jahresber. 1933. — Deutsch. med. Wechschr. 1934 II, 1197. — O. DALMER u. TH. MOLL: Zeitschr. physiol. Chem. 1933, 222, 116.

<sup>2</sup> L. J. HARRIS u. S. N. RAY: Biochem. Journ. 1933, 27, 303.

<sup>3</sup> O. A. BESSÉ u. C. G. KING: Journ. Biol. Chem. 1933, 103, 687.

#### 4. Mikromethode von BIRCH, HARRIS und RAY<sup>1</sup> zur Vitamin-C-Bestimmung in verschiedenen Nahrungsstoffen.

Die Methode gründet sich auf die Arbeiten von HARRIS und RAY<sup>2</sup> und stellt eine modifizierte TILLMANSSche Methode dar, wobei, entgegen TILLMANS, in kräftig saurer Lösung ( $p_H = 2,5$ ) titriert wird. Hierbei ist der Indicator rot, im Gegensatz zum Blau der ursprünglichen TILLMANSSchen Methode.

Methode. Eine kleine Menge des zu untersuchenden Nahrungsstoffes wird abgewogen und mit Sand und unter Zugabe von so viel 20%iger Trichloressigsäure fein verrieben, daß die Endkonzentration der Säure 5% beträgt. Der Extrakt wird dann auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, wobei bei wenig vitamin-C-haltigen Stoffen eine geringere, bei vitamin-C-reichen Stoffen eine größere Verdünnung gewählt wird (bei Citronensaft z. B. 1:10). Der filtrierte Extrakt wird in eine Mikrobürette (0,1 ccm-Teilung) eingefüllt. Hierauf wird in ein kleines Reagensröhrchen 0,05 ccm einer frisch bereiteten und eingestellten 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung (ungefähr 0,1 M) eingefüllt. Danach läßt man den Trichloressigsäureextrakt der Mikrobürette so lange einfließen, bis die rote Farbe, die der Indicator in saurer Lösung sofort annimmt, gerade verschwindet. Die Titration muß in 2—3 Minuten beendet sein. Andernfalls kann ein Irrtum durch Verblässen der Farbe des Indicators eintreten.

Herstellung der Indicatorlösung. Etwa 0,1 g des Farbstoffes wird in eine kleinere Menge kochenden destillierten Wassers gegeben. Der Rest des ungelösten Farbstoffes wird abfiltriert und erneut mit kochendem Wasser extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden auf 50 ccm aufgefüllt. Die Indicatorlösung wird gegen reine Ascorbinsäure eingestellt. Die Ascorbinsäurelösung wird ihrerseits wieder gegen Jod titriert (vgl. oben).

a) Anwendung der Mikromethode bei Harn und Milch. Die Mikromethode von BIRCH wurde von HARRIS, RAY und WARD<sup>3</sup> für Harn erfolgreich angewendet. Der zu untersuchende Harn wird dazu mit Trichloressigsäure so weit versetzt, daß die Endkonzentration 5% beträgt. Darauf wird die Titration in der Mikrobürette, wie in der Originalmethode beschrieben, ausgeführt. Die Titrationsen müssen bei der Harnuntersuchung sofort oder wenige Minuten nach der Entleerung des Harns aus der Blase ausgeführt werden. Der Endpunkt der Titration muß auch in ungefähr 1 Minute erreicht sein. Andernfalls können Irrtümer durch andere reduzierende Harnsubstanzen hervorgerufen werden.

Mit der gleichen Methode bestimmte KON<sup>4</sup> den Vitamin-C-Gehalt der Milch.

b) Vorgehen zur Extraktion pflanzlicher und tierischer Gewebe. BESSÉ und KING (S. 1552) empfehlen zur Extraktion pflanzlicher Gewebe 8%ige Essigsäure zu nehmen und auch hierin zu titrieren während für die meisten tierischen Gewebe Trichloressigsäure in 8%iger Lösung vorzuziehen ist. Es werden dazu 5—10 g abgewogen, mit Sand (sauer) ausgewaschen, in einem Mörser fein zerrieben und 25 ccm der betreffenden 8%igen Säuren (Trichloressigsäure oder heiße Essigsäure) zugegeben, bis ein dünner Brei entstanden ist. Hierauf wird zentrifugiert und der Extrakt abgegossen. Weitere 10 ccm der zur Extraktion verwendeten Säurelösung werden zum Auswaschen des Mörsers verwendet und dann mit dem Zentrifugenrückstand vermischt, worauf erneut zentrifugiert wird. Der Waschprozeß wird nochmals mit 5 ccm wiederholt. Die dekantierten Extrakte enthalten dann das gesamte Vitamin C. Sie werden auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und von diesem aliquote Teile zur Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol verwendet. Hierbei sollen 10 ccm der Extraktlösung mit 40 ccm destilliertem Wasser oder 8%iger Säurelösung gemischt werden.

c) Mercuriacetatfällung nach EMMERIE. Da auch Cystein und Ergothionein sowie andere Stoffe, die in tierischen Geweben und Flüssigkeiten vorkommen, den Farbstoff in saurer Lösung reduzieren, empfiehlt EMMERIE<sup>5</sup> die Ausfällung dieser störenden Stoffe mit 20%iger wäßriger Mercuriacetatlösung bei saurer Reaktion. Die Ascorbinsäure bleibt in reversibel oxydierter Form in Lösung und kann durch Schwefelwasserstoffbehandlung

<sup>1</sup> TH. W. BIRCH, L. J. HARRIS u. S. N. RAY: Biochem. Journ. 1933, 27, 590.

<sup>2</sup> L. J. HARRIS u. S. N. RAY: Biochem. Journ. 1933, 27, 303.

<sup>3</sup> L. J. HARRIS, S. N. RAY u. A. WARD: Biochem. Journ. 1933, 27, 2011.

<sup>4</sup> S. K. KON: Nature (Lond.) 1933, 64.

<sup>5</sup> A. EMMERIE: Biochem. Journ. 1934, 28, 268.

quantitativ reduziert werden. Trotzdem können insbesondere in tierischen Geweben noch weitere Störungen vorkommen. Gluthation stört in saurer Lösung nicht (VAN EEKELN und Mitarbeiter<sup>1</sup>).

### 5. Weitere Bestimmungsmethoden.

a) Jodmethoden. STEPP und SCHRÖDER<sup>2</sup> bedienten sich zur Feststellung von vorher zugesetzter Ascorbinsäure in Nährbodenlösung einer Titration in 0,01 N.-Jodlösung. Dazu wurde die zu untersuchende Flüssigkeit mit 16%iger Schwefelsäure ( $\frac{1}{5}$  des Volumens) versetzt und unter Verwendung von Stärke als Indicator mit 0,01 N.-Jodlösung titriert. Die Jodlösung wurde wiederholt gegen reine Ascorbinsäure eingestellt. Auch v. DRIGALSKI<sup>3</sup> benutzte die gleiche Methode zur Titration von Harn.

Im Hinblick darauf, daß Jod von zahlreichen Substanzen reduziert und gebunden wird, kann die Verwendung der Jodtitration bei komplizierten Substanzgemischen zu großen Irrtümern Anlaß geben, wie besonders auch aus den Bestimmungen von MARTINI und BONSIGNORE<sup>4</sup> hervorgeht.

b) Titration mit Methylblau (vgl. HARRIS und RAY, S. 1553). MARTINI und BONSIGNORE haben eine neue Titrationmethode vorgeschlagen, in der sie gegen Methylblaulösung titrieren. Die Extraktion erfolgt durch Zerreiben mit Quarzsand und 8%iger Trichloressigsäurelösung. Hierauf wird zentrifugiert, mit Trichloressigsäure nachgewaschen und schließlich auf 25 ccm mit Trichloressigsäurelösung aufgefüllt. Zur Titration werden 5 ccm Trichloressigsäurelösung in ein Reagensröhrchen gebracht. Hierzu gibt man 2 ccm einer alkalischen Lösung, die 30 g neutrales Natriumcitrat und 8 g Natriumbicarbonat in 200 ccm enthält (Lösungsmittel: Wasser), ferner 1 ccm einer 5%igen Natriumthiosulfatlösung. In ein weiteres gleiches Röhrchen füllt man zum Vergleich 8 ccm Wasser. In diese beiden Röhrchen werden nunmehr aus einer BANGSchen Mikrobürette je 2 ccm Methylblaulösung gegeben (wäßrige Methylblaulösung 1:10000). Die Röhrchen werden darauf dem Licht ausgesetzt. Ist alles entfärbt, fügt man erneut Methylblau zu und belichtet wiederum. Dies setzt man so lange fort, bis nach Belichtung die gleiche Färbung wie im Kontrollröhrchen besteht. Als Lichtquelle kann man direktes Sonnenlicht oder besser eine künstliche Lichtquelle verwenden. Verfasser benutzten eine Lampe von PHILIPS für Kinoprojektion von 300 Watt mit Reflektor und Konvektlinse. Das Reagensglas befindet sich im Brennpunkt. Die verbrauchte Methylblaumenge dient zur Berechnung des vorhandenen Vitamins C, wozu man die Methylblaulösung zweckmäßigerweise auf reine Ascorbinsäure, die man in Trichloressigsäure titriert, einstellt. Die Methode bedarf noch der Nachprüfung.

### 6. Silbernitratmethode.

Zur Silbernitratreaktion hat HARDE<sup>5</sup> noch empfohlen, vor Anwendung der 4%igen Silbernitratlösung 15—30 Minuten mit Methylalkohol zu behandeln. Dann zeigen auch Gewebe, die mit Silbernitrat keine Reaktion geben, ein positives Ergebnis. Zur Darstellung des Vitamins C in Gewebsschnitten wurde von GIROUD und LEBLOND<sup>6</sup> eine ausführliche Vorschrift ausgearbeitet, die es gestattet, mit Hilfe von Silbernitrat in pflanzlichen sowohl wie in tierischen Geweben unter dem Mikroskop einen Vitamin-C-Nachweis zu führen.

### 7. Das internationale Standardpräparat.

Die 2. Internationale Vitaminkonferenz (S. 1544) hat reine 1-Ascorbinsäure als internationalen Standard angenommen. Als Einheit wurde die Aktivität von 0,05 mg 1-Ascorbinsäure festgesetzt. Diese Menge entspricht ungefähr  $\frac{1}{10}$  der täglichen Dosis, die notwendig ist, um deutliche makroskopische Skorbuterscheinungen bei jungen Meerschweinchen zu verhüten. Die reine Ascorbinsäure, die zu diesem Zwecke verwendet und vom National Institute for Medical Research, London, verteilt wird, soll bei 192° unkorrigiert schmelzen, aschefrei sein und bei der Elementaranalyse die Formel  $C_6H_8O_6$  ergeben. 10 mg sollen 11,4 ccm wäßriger 0,01 N.-Jodlösung bei Verwendung von Stärke als Indicator benötigen.

<sup>1</sup> M. VAN EEKELN, A. EMMERLE, B. JOSEPHY u. L. K. WOLFF: Klin. Wehschr. 1934 I, 564.

<sup>2</sup> W. STEPP u. H. SCHRÖDER: Klin. Wehschr. 1935 I, 147.

<sup>3</sup> W. v. DRIGALSKI: Klin. Wehschr. 1935 I, 338, 542.

<sup>4</sup> E. MARTINI u. A. BONSIGNORE: Biochem. Zeitschr. 1934, 273, 170; Boll. Soc. ital. Biol. sper. 1934, 9, 388.

<sup>5</sup> E. HARDE: Compt. rend. Paris 1934, 116, 153.

<sup>6</sup> A. GIROUD u. C.-P. LEBLOND: Arch. Anat. microsc. 1934, 30, 105; Ber. ges. Physiol. 1935, 83, 84.

# Mykologische Untersuchungen<sup>1</sup>.

Von

Professor **DR. C. GRIEBEL** - Berlin.

Mit 111 Abbildungen.

Die folgende Darstellung der mykologischen Untersuchungsverfahren ist nach Möglichkeit so gehalten worden, daß der durch den botanischen Unterricht mit den nötigen allgemeinen mykologischen Kenntnissen ausgerüstete Chemiker durch eigene Kraft die erforderlichen praktischen Kenntnisse erweitern kann. Für eingehendere mykologische Studien muß die unten angeführte Spezialliteratur herangezogen werden.

Die kurze Übersicht über die Systematik der Pilze am Schlusse dieses Abschnittes ist nur für die erste Orientierung des Anfängers bestimmt, der sich nach Aneignung einiger Formenkenntnis später auch in den größeren Spezialwerken leicht zurechtfinden wird. Für die meisten Untersuchungen der Praxis wird aber schon die Kenntnis der in diesem und später im speziellen Teil des Werkes beschriebenen und abgebildeten Arten ausreichen.

Unberücksichtigt geblieben sind die speziellen Verfahren zum Nachweis von Krankheitserregern. Diese Methodik gehört in das Arbeitsgebiet der hygienischen Institute und erfordert eine sorgfältige Sonderausbildung, die der Lebensmittelchemiker im allgemeinen nur selten Gelegenheit hat zu erwerben.

An Sonderwerken, die auch bei der Bearbeitung dieses Abschnittes ausgiebig benutzt worden sind, seien hier folgende aufgeführt.

**LAFAR**: Handbuch der technischen Mykologie. Jena 1904—1914. Ein 5 Bände umfassendes vorzügliches Compendium, in dem auch die Mykologie der Lebensmittel eingehend berücksichtigt ist.

**F. FUHRMANN**: Einführung in die Grundlagen der technischen Mykologie. Jena 1926. Das Werk ist zur Einführung in dieses Gebiet sehr geeignet, jedoch ist nicht überall die neuere Literatur berücksichtigt.

**ARTH. MEYER**: Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903. Es ist ein vorzügliches Werk über die bakteriologischen Arbeitsverfahren.

**K. B. LEHMANN u. R. O. NEUMANN**: Bakteriologische Diagnostik, 7. Aufl. München 1927. Ein Lehrbuch der Bakteriologie, das zugleich die Arbeitsverfahren und eine Beschreibung zahlreicher Arten enthält. Der den I. Teil bildende Atlas bringt für alle wichtigen Arten zum Teil farbige Abbildungen von Kulturen und Ausstrichpräparaten; deshalb besonders für Anfänger sehr zu empfehlen.

**OLSEN**: Bakteriologisches Taschenbuch, 28. Aufl. Leipzig 1927. Es ist ein billiges und sehr brauchbares Buch mit Vorschriften für Färbungen, Nährböden und Kulturverfahren, das aber hauptsächlich auf den Nachweis der Krankheitserreger zugeschnitten und daher in erster Linie für Mediziner berechnet ist.

**M. KLIMMER**: Technik und Methodik der Bakteriologie und Serologie. Berlin 1923. Eine sehr empfehlenswerte Anleitung, die sich auf die wichtigeren Methoden beschränkt.

**A. JANKE**: Allgemeine technische Mikrobiologie. I. Teil: Die Mikroorganismen. Dresden u. Leipzig 1924. Das Buch behandelt die Morphologie und Systematik der Mikroorganismen und ist durch zahlreiche Literaturangaben besonders wertvoll.

<sup>1</sup> Bearbeitet unter Benutzung des von Prof. Dr. A. SPIECKERMANN bearbeiteten gleichnamigen Abschnittes in **J. KÖNIG**: Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel, 4. Aufl. Bd. 3, I, S. 613—711. Berlin 1910.

KRAUS u. UHLENHUTH: Handbuch der mikrobiologischen Technik. 3 Bände. Berlin 1923. Ein die gebräuchliche Methodik und Technik umfassendes Nachschlagewerk.

O. BREFELD: Die Kultur der Pilze. Münster 1908. Eine Darstellung des BREFELDSchen Verfahrens zur Kultur höherer Pilze mit zahlreichen wertvollen Angaben über Arbeitsverfahren.

E. KÜSTER: Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Leipzig 1921. Die Schrift bietet eine vorzügliche Anleitung zur Züchtung von Pilzen und anderen Kleinlebewesen und enthält zahlreiche Vorschriften für diese Untersuchungen.

H. WILL: Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze, Bierhefe, Bier und Brauwasser, zur Betriebskontrolle sowie zur Hefenreinzucht. München u. Berlin 1909. Das Werk enthält eine außerordentlich ausführliche und sorgfältige Darstellung der im Titel aufgeführten Untersuchungsverfahren, dagegen keine Beschreibung der Gärungsorganismen.

KLÖCKER: Die Gärungsorganismen. Stuttgart 1924. Die Schrift bringt eine genaue Beschreibung der Arbeitsverfahren für Untersuchung der Organismen der Gärungsgewerbe sowie eine Beschreibung der wichtigsten Organismen und ist sehr übersichtlich.

P. LINDNER: Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 6. Aufl. Berlin 1930. Der Inhalt entspricht ungefähr dem des vorhergehenden Werkes; es enthält aber zahlreiche Einzelheiten und ist daher für den Anfänger etwas umfangreich und schwerer übersichtlich; es eignet sich mehr für den Gärungsschemiker von Beruf.

P. LINDNER: Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, 6. Aufl. Berlin 1928. Enthält zahlreiche ausgezeichnete Mikrophotogramme.

W. HENNEBERG: Handbuch der Gärungsbakteriologie. Berlin 1926. Ebenfalls hauptsächlich für den Gärungsschemiker von Beruf bestimmt, aber als Nachschlagewerk sehr zu empfehlen.

MIGULA: Das System der Bakterien. Jena 1897. Es ist das wichtigste botanische systematische Werk über Bakterien.

RABENHORST-WINTER: Kryptogamenflora, 2. Aufl. Bd. 1 (Pilze), Abt. 1—10. 1886—1921.

W. MIGULA: Kryptogamenflora, Bd. 3 (Pilze). Gera 1910—1913.

G. LINDAU: Die mikroskopischen Pilze, 2. Aufl. Berlin 1922.

LINDAU-ULBRICH: Die höheren Pilze, 3. Aufl. Berlin 1930.

## I. Einrichtung mykologischer Laboratorien.

### A. Arbeitsraum.

In der Mehrzahl der Fälle wird bei der Einrichtung eines mykologischen Laboratoriums bezüglich der Räume keine große Auswahl möglich sein; doch lassen sich auch unter bescheidenen Verhältnissen Erfolge erzielen. Es sind zum mindesten zwei Räume erforderlich, von denen der eine für Arbeiten reserviert wird, die eine besonders reine ruhige Atmosphäre erfordern, wie die Arbeiten mit Bakterien und Hefen, während Untersuchungen mit Schimmelpilzen, deren verstäubende, leichte Sporen einen Raum für andere Arbeiten zuweilen unbrauchbar machen können, in dem anderen Raum ausgeführt werden müssen.

Die Lage wenigstens eines der Zimmer sei möglichst nach Norden, um günstiges Licht zum Mikroskopieren zu erhalten. Zugluft ist nach Möglichkeit auszuschließen; es darf daher auch das mykologische Laboratorium kein Durchgangsraum sein, da der Verkehr stets Staub und mit diesem Keime aufwirbelt. Wo dies nicht vermieden werden kann, läßt man vorteilhaft den Fußboden zeitweilig mit 1 %igem Glycerinwasser aufwaschen oder mit Fußbodenöl streichen, wodurch der Staub gebunden wird. Nach Möglichkeit zu vermeiden ist auch eine unmittelbare Verbindung zwischen mykologischen und chemischen Arbeitsräumen, da die Instrumente, insbesondere die Mikroskope unter den Säuredämpfen bald leiden.

Der Fußboden der Laboratorien muß möglichst glatt sein, so daß er öfter feucht aufgenommen werden kann. Für die Wände empfiehlt sich ein Anstrich mit weißer Ölfarbe, der öfter abgewaschen werden muß. Der Arbeitstisch wird am besten etwa 1 m hoch gewählt. Die Platte muß abwaschen mit Spiritus und Desinfektionsmitteln vertragen und wird deshalb mit einem

Gemisch von salzsaurem Anilin, Kaliumchlorat und Kupferchlorid schwarz gebeizt. Von den verschiedenen Vorschriften sei hier die von KLÖCKER mitgeteilt.

Man braucht zwei Lösungen, nämlich 1. 600 g Anilinchlorhydrat in 4 l Wasser und 2. 86 g Kupferchlorid, 67 g Kaliumchlorat, 33 g Ammoniumchlorid in 1 l Wasser. Man mischt unmittelbar vor dem Gebrauch 4 Teile der Lösung 1 mit 1 Teil der Lösung 2 und trägt diese Mischung 4—5mal in eintägigen Pausen auf die Tischplatte auf. Dann wird mit Leinölfirnis eingerieben. Die gebeizten Platten können ohne Schaden mit Spiritus oder wäßriger Sublimatlösung (1—2‰) abgewaschen werden.

Die Arbeitstische sollen gut schließende Schubfächer zum Aufbewahren der wichtigsten, täglich gebrauchten Arbeitsgeräte besitzen. Auf dem Tische sollen im allgemeinen nur ein Gestell mit den wichtigsten Reagenzien und Farblösungen sowie ein Glas für Impfinstrumente (Platindrähte verschiedener Form, Stahlnadeln, Präpariernadeln, Pinzetten, Glasstäbe u. a.) stehen. Diese Gegenstände müssen täglich sorgfältig von Staub gereinigt werden. Wo in erster Linie mit Bakterien gearbeitet wird und daher öfteres Beschmutzen der Tischplatte mit Farblösungen zu befürchten ist, deckt man auf den Arbeitsplatz vorteilhaft einige Bogen Filtrierpapier, die öfter erneuert werden.

Außer dem Arbeitstisch soll der Arbeitsraum noch ein kleines Regal für Reagenzien und Schränke zum Aufbewahren von Kulturen und Nährböden enthalten.

Für Arbeiten, die eine völlig staubfreie Luft erfordern (z. B. Umfüllen von Kulturen), besteht in größeren mykologischen Laboratorien zuweilen ein „steriler Raum“. Meist wird man sich mit dem von HANSEN vorgeschlagenen sterilen Kasten (Abb. 1) begnügen müssen, der auch vollständig genügt.

Er besteht aus einem viereckigen Holzrahmen von 63:56:50 cm, in den Glasscheiben eingekittet sind. Der Boden besteht aus Holz. Die vordere Scheibe kann in einem Falz aufwärts geschoben werden. Die Holzteile sind innen und außen mit Leinölfirnis eingerieben. Auf den Boden kann eine Schale aus Zinkblech gestellt werden. Man wäscht den Kasten vor der Benutzung mit Sublimatlösung oder Spiritus aus und läßt ihn dann geschlossen etwa 1 Stunde stehen, damit sich Staub und Keime absetzen können. Während der Arbeiten muß der Kasten immer hinlänglich feucht sein, weil die Keime sonst wieder aufgewirbelt werden können. Beim Arbeiten wird das Schiebefenster nur soweit gehoben, daß die Hände eben bequem arbeiten können. Die Hände müssen vorher durch gründliches Abwaschen und Abbürsten mit Seife und nachheriges Einreiben mit Sublimatlösung (1‰) desinfiziert werden.

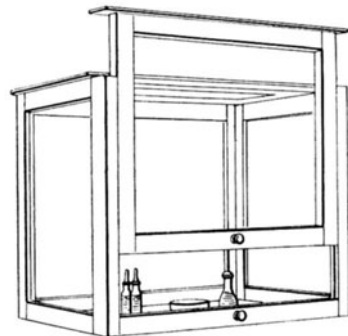


Abb. 1. HANSENS steriler Kasten. (Nach KLÖCKER.)

## B. Brutschränke (Thermostate).

Wo mykologische Untersuchungen regelmäßig ausgeführt werden, ist die Beschaffung eines oder mehrerer Thermostate, die die andauernde Züchtung von Pilzen bei bestimmten Temperaturen gestatten, nicht zu umgehen. Thermostate werden von zahlreichen Firmen in der verschiedensten Ausführung hergestellt. Die besseren Fabrikate bestehen im allgemeinen aus einem auf einem vierbeinigen Gestell ruhenden mehr oder minder geräumigen Kasten aus Kupferblech (Abb. 2) mit doppelten Wandungen, zwischen denen sich Wasser befindet. Die vordere offene Seite des Kastens wird durch eine innere Glastür und eine äußere doppelwandige Kupferblechtür verschlossen. Außen ist der Kasten

zur besseren Wärmeisolierung mit Filz oder Linoleum bekleidet. An der Seite trägt er ein Wasserstandrohr, um den Wasserstand zwischen den Wan-

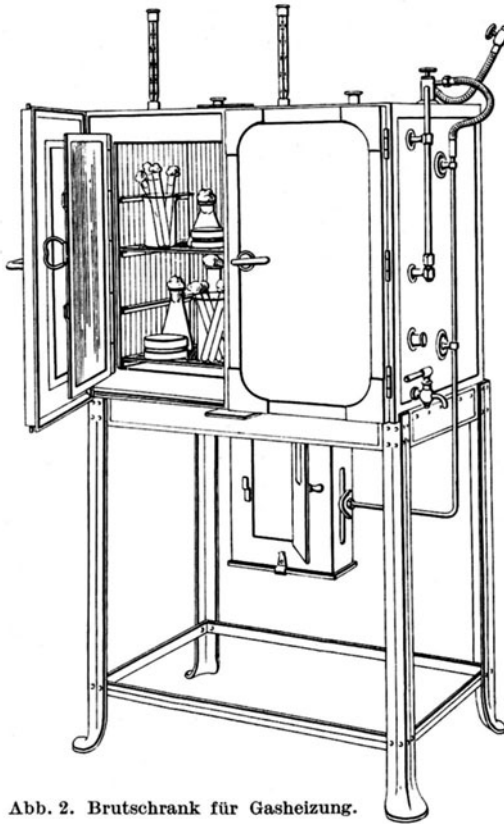


Abb. 2. Brutschrank für Gasheizung.

dungen kontrollieren zu können, ferner meist zwei mit durchlöchernten Kappen verschließbare, bis in das Innere reichende Ventilationsöffnungen. Die Decke des Kastens besitzt zwei in den Wasserraum führende Öffnungen für ein Thermometer, den Thermoregulator und zum Wassereinfüllen und zwei in den Innenraum führende Öffnungen für Thermometer und Ventilation.

Die Heizung erfolgt meist durch einen KOCHSchen Sicherheitsbrenner für Gas. Neuerdings wird vorwiegend der elektrische Strom hierzu verwendet, der deswegen allen anderen Heizarten vorzuziehen ist, weil hierbei eine Verunreinigung der Luft vermieden wird. Bei dem KOCHSchen Sicherheitsbrenner (Abb. 3) erhitzt die Heizflamme eine mit einem Ende am Brenner befestigte Metallfeder (*a*). Das andere freie Ende der Feder trägt einen Stift, der bei erhitztem Zustande der Feder das belastete Ende eines Hebels (*bc*) hält, dessen Drehpunkt (*c*) im Hahn des Gasbrenners liegt. Er-

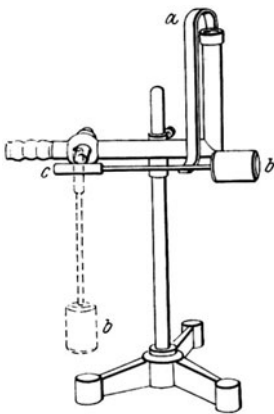


Abb. 3. Sicherheitsbrenner nach KOCH.

lischt der Brenner aus irgendeinem Grunde, so zieht sich die Feder zusammen, der Hebel verliert seinen Stützpunkt, dreht sich nach unten und schließt den Gashahn. Zum Schutze gegen Luftzug wird der Brenner gewöhnlich mit einem Schutzkasten umgeben.

Um in den Thermostaten eine konstante Temperatur dauernd zu erhalten, benützt man Thermoregulatoren, die je nach der Wärmequelle verschieden konstruiert sind. Alle für Gasheizung bestimmten Thermoregulatoren sind grundsätzlich so gebaut, daß bei der Erreichung der gewünschten Temperatur der Hauptgasstrom gedrosselt oder verschlossen wird, so daß ein kleines Flämmchen eben noch brennt. Die Verbindung dieser Regulatoren mit dem Gashahn einerseits und dem Brenner andererseits stellt man entweder durch angelötetes Bleirohr oder durch Metallschläuche her. Jedenfalls sind Gummischläuche der Feuersgefahr wegen zu vermeiden.

Vielmehr finden Dampftensionsregulatoren Verwendung, von denen der nach LOTHAR MEYER genauer beschrieben werden soll (Abb. 4).

Der aus Glas bestehende Regulator *A* wird in die durchlöchernte Metallhülse *B* gesteckt und in den Wasserraum des Thermostaten gesenkt. In dem abgeschlossenen Raum *d* befindet sich etwas Quecksilber und je nach der Höhe der gewünschten Temperatur Äther, Alkohol oder Luft. Die Spannkraft der Dämpfe dieser Stoffe treibt das Quecksilber nach oben, wo es einen Seitenschlitz des Eisenrohres *e* mehr oder minder verschließt. Das Gas tritt bei *a* in das graduierte Messingrohr *g* und gelangt von dort durch den Schlitz des Eisenrohres *e* in die zur Heizflamme führende Leitung *b*. Um zu verhindern, daß bei zu starker Erwärmung die Gaszufuhr ganz abgeschnitten wird, besteht noch eine Nebenleitung unter Umgehung des Regulators. Durch den Hahn *c* wird diese Nebenzufuhr so geregelt, daß die Notflamme ohne Einfluß auf die Temperatur des Brutschrankes bleibt.

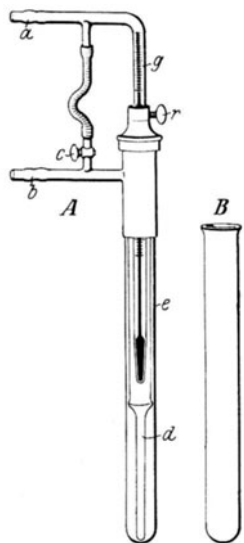


Abb. 4. *A* Thermoregulator, *B* Hülse dazu. (Nach L. MEYER.)

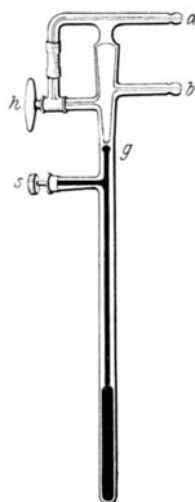


Abb. 5. Thermoregulator nach REICHERT.

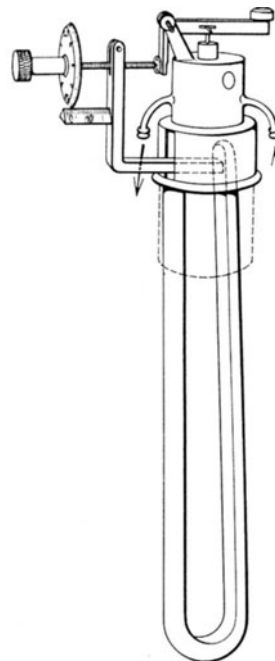


Abb. 6. Metallthermoregulator für Gasheizung.

Will man den Regulator, der für bestimmte Temperaturgrenzen fertig gefüllt von den Handlungen geliefert wird, benutzen, so füllt man den Thermostaten mit destilliertem Wasser von annähernd der gewünschten Temperatur oder erwärmt, falls man mit kaltem Wasser gefüllt hat, mit einem Bunsenbrenner entsprechend schnell, setzt den Regulator in der Metallhülse in den Wasserraum ein und zieht die Messingröhre *g* soweit heraus, daß die Heizflamme möglichst klein wird. Nach einigen Stunden regelt man dann je nach Bedarf die Gaszufuhr durch Herausziehen oder Hineinschieben des Messingrohrs *g*.

Auch der nur mit Quecksilber gefüllte Thermoregulator nach REICHERT (Abb. 5) ist noch vielfach im Gebrauch.

Alle mit Quecksilber gefüllten, aus Glas hergestellten Regulatoren, von denen es eine ganze Reihe Konstruktionen gibt, haben den Nachteil, daß bei vorkommendem Bruch leicht Quecksilber in den Thermostaten gelangt, was gewöhnlich ein Undichtwerden der Kupferwände zur Folge hat.

Deshalb finden seit einiger Zeit vorwiegend vollständig aus Metall gearbeitete Regulatoren verschiedener Konstruktion Verwendung, die zudem eine genauere



Einstellung einer bestimmten Temperatur gestatten. Abb. 6 zeigt ein solches Instrument mit Präzisionseinstellung.

Für Thermostate, die durch elektrischen Strom geheizt werden, finden elektrische Thermoregulatoren Verwendung. Auch diese sind in verschiedenen Konstruktionen im Handel.

Für die meisten Untersuchungen genügen die Thermostate in der oben beschriebenen Ausführung. Für besondere Zwecke ist es jedoch wichtig, bei verschiedenen Temperaturen gleichzeitig untersuchen zu können. Diesen Anforderungen genügt der Thermostat von PANUM, der verschiedene Kammern mit Temperaturen von 0—40° besitzt. Eine eingehendere Beschreibung des im CARLSBERG-Laboratorium gebrauchten Modells gibt KLÖCKER<sup>1</sup>.

Thermostate für Temperaturen unter jener der Umgebung bestehen aus Kupferblechkasten, in denen kaltes Wasser zirkuliert. Angaben über die Einrichtung eines solchen nach PETERSEN bringt KLÖCKER<sup>2</sup>.

Für mikroskopische Untersuchungen bei höherer Temperatur dienen Mikroskopthermostate oder heizbare Objektische.

### C. Geräte zum Abimpfen.

Zur Vornahme von Impfungen benutzt man hauptsächlich Platindrähte in Form von Nadeln, Ösen oder Spateln. Man hält vorteilhaft Drähte verschiedener Stärke und Länge vorrätig. Platinnadeln werden zur Anlage von Stich- und Strichkulturen sowie zum Abstechen von Kolonien benutzt. Man darf sie nicht zu schwach wählen, am besten 0,4 mm stark. Für die meisten Zwecke genügt eine Länge von 5 cm. Für die Anlage anaerober Stichtkulturen braucht man etwa 8 cm lange Nadeln. Zum Abstechen von Plattenkolonien eignen sich in schwierigen Fällen besser Drähte mit spatelförmig verbreiteter Spitze. Zum Verimpfen von Flüssigkeiten verwendet man Drähte mit Ösen von etwa 2,5 mm Durchmesser. Zum Herstellen kleinerer Tropfen für Kulturen im hohlen Objektträger nimmt man vorteilhaft sehr dünne Drähte mit Ösen von etwa 1 mm Durchmesser (Abb. 7).

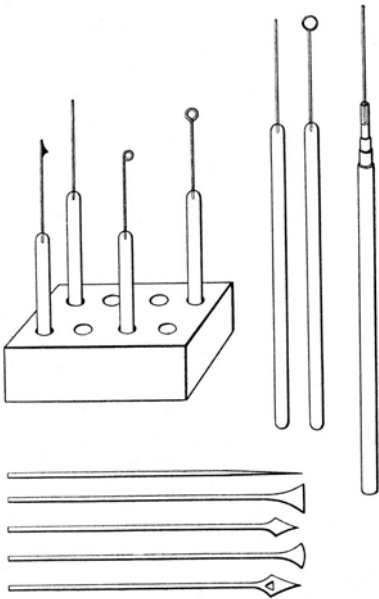


Abb. 7. Platindrähte verschiedener Form in Glasstäben; rechts Metallhalter; oben Gestell für Platindrähte.

Drähten zwar aus, jedoch ist das Springen der Stabspitze beim Ausglühen der Drähte nicht ganz zu vermeiden. Deshalb ist der KOLLESche Aluminiumhalter viel mehr zu empfehlen. Beim Arbeiten erhitzt man die Drähte in der Bunsenflamme zum Glühen und brennt auch den Halter soweit ab, als er ins Kulturgefäß beim Arbeiten hineinragt. Nach dem Abbrennen läßt man Draht

<sup>1</sup> KLÖCKER: Die Gärungsorganismen, 3. Aufl. S. 30. Stuttgart 1924.

<sup>2</sup> KLÖCKER: Die Gärungsorganismen, 3. Aufl. S. 35. Stuttgart 1924.

und Halter, indem man ihn frei in der Luft hält, erkalten; sonst leiden die Keime unter der Erhitzung. Unmittelbar nach dem Gebrauch wird der Platindraht jedesmal ausgeglüht. Man bewahrt die Drähte am besten stehend in einem entsprechenden Holzgestell (Abb. 7) auf.

Handelt es sich darum, sehr kleine, mit der Platinnadel schwer faßbare Kolonien abzustechen oder Impfmateriale unter möglichst geringer Gefahr der Spontaninfektion in ein Kulturgefäß zu bringen, so verwendet man mit Vorteil unmittelbar vor der Benutzung durch Ausziehen von Glasröhren hergestellte Cappillaren, deren mit dem Material behaftete Spitze man in dem Kulturgefäß abbricht. Sehr kleine flüssige Kolonien



Abb. 8. Kappennadeln nach ARTH. MEYER. a ohne Öse, b mit Öse, c mit Spatel.

auf Objektträgern kann man in Stückchen sterilisierten Fließpapiers, die man mit einer sterilisierten Pinzette hält, aufsaugen und in dieser Form auf Nährböden übertragen. O. BREFELD schlägt für die Impfung von Flüssigkeiten mit Sporen höherer Pilze blanke, nur durch Eintauchen in Spiritus sterilisierte Lanzettnadeln aus Stahl vor.

Die zum Sterilisieren erforderlichen Geräte werden im folgenden Abschnitt II behandelt.

## II. Sterilisierung (Keimfreimachung).

Vorbedingung für erfolgreiches mykologisches Arbeiten ist die Sterilität oder vollständige Keimfreiheit der Nährböden und Geräte. Als Sterilisierungsmittel kommen in Betracht Filtration durch keimdichte Filter, Behandlung mit Chemikalien und Erhitzung. Die Wahl des Sterilisierverfahrens hängt von der Art des zu sterilisierenden Gegenstandes und von dem Zwecke der Sterilisierung ab. Die Filtration kommt nur bei Flüssigkeiten in Betracht, die stärkere Eingriffe nicht vertragen, ohne wesentliche Veränderungen in ihrer Zusammensetzung zu erleiden. Man wendet sie besonders an, wenn es darauf ankommt, Keimfreiheit zu erzielen, ohne etwa vorhandene Enzyme zu schädigen. In solchen Fällen sind auch manche Chemikalien gut zu gebrauchen.

Das bei weitem am häufigsten angewendete Mittel zur Sterilisierung ist jedoch die trockene und feuchte Wärme. Trockene Wärme kommt in erster Linie für trockene, feste, nicht leicht veränderliche Gegenstände in Betracht. Sie findet in erster Linie Verwendung bei der Sterilisierung von Apparaten aus Glas und Metall. Kleinere Gegenstände, wie Nadeln, Messer, Drähte, Pinzetten sterilisiert man durch Abbrennen in der Bunsenflamme unmittelbar vor dem Gebrauche. Natürlich dürfen die Gegenstände während des Erkaltes nicht mit keimhaltigen Gegenständen in Berührung kommen. Messer legt man daher mit nach oben gerichteter Schneide auf sterile Unterlagen oder man läßt sie mit der Schneide frei in die Luft ragen. Auch die Oberfläche mancher festen Stoffe, deren Inneres auf Keime untersucht werden soll, macht man bisweilen durch Absengen mit der Bunsenflamme oder Abbrennen mit einem glühenden Messer steril (z. B. Fleischstücke).

Größere Gegenstände, die eine Erhitzung über 100° ohne Schaden aushalten, insbesondere solche aus Glas, sterilisiert man besser in einem Trockenschrank (Abb. 9) mit doppelten Wandungen (Heißluftsterilisator), der mit einem Pilz- oder Schlangenbrenner geheizt wird. Neuerdings werden vielfach elektrische Sterilisiereschränke verwendet. Sämtliche Gegenstände sind in trockenem

Zustand in den Schrank zu bringen. Die zur Aufnahme von Nährsubstanzen bestimmten Röhren und Kolben werden hierbei mit einem Wattebausch aus nicht entfetteter Baumwolle verschlossen. Um die gegen trockene Hitze sehr widerstandsfähigen Dauerformen mancher Bakterienarten sicher abzutöten, bedarf es einer zweistündigen Erwärmung auf 150—160°. Man

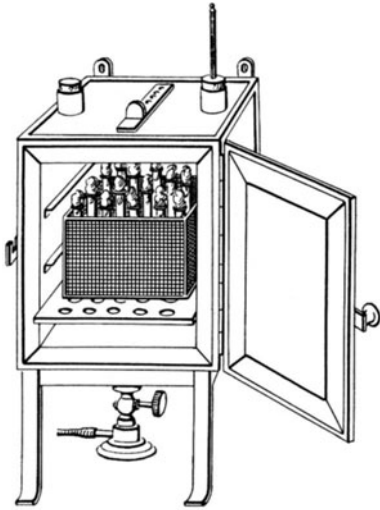


Abb. 9. Heißluftsterilisateur.

läßt die sterilisierten Gegenstände im Trockenschrank erkalten und benutzt sie dann möglichst sofort. Kommt es darauf an, die Gegenstände einige Zeit steril vorrätig zu halten, so legt man sie vor dem Sterilisieren in Eisenblechbüchsen (Abb. 10), die für Pinzetten, Pipetten, Petrischalen usw. käuflich zu haben sind. Man kommt aber auch mit Papierumhüllungen sehr gut aus. Platten werden packweise, Pipetten und Petrischalen stückweise in dünnes festes Papier gewickelt und dann sterilisiert. Die sterilisierten Gegenstände werden in ihren Umhüllungen am besten im Trockenschrank aufbewahrt. Haben sie längere Zeit gelegen, so ist es stets zu empfehlen, sie vor dem Gebrauch nochmals zu sterilisieren.

Für Flüssigkeiten und für solche feste Gegenstände, die eine Erhitzung über 100° nicht vertragen, kommt zum Sterilisieren nur die feuchte Wärme in Betracht, die viel energischer wirkt als trockene, wie zuerst KOCH und

WOLFFHÜGEL nachgewiesen haben. Sie wird entweder in Form von heißem oder kochendem Wasser, oder in Form vom Dampf angewendet. Flüssigkeiten kann man, falls sie nicht zu stark schäumen oder stoßen, und wenn eine gewisse Konzentration ihrer Verwendung nicht hinderlich ist, in Glaskolben durch Kochen über der freien Flamme sterilisieren. Der Hals des Kolbens wird vorher durch

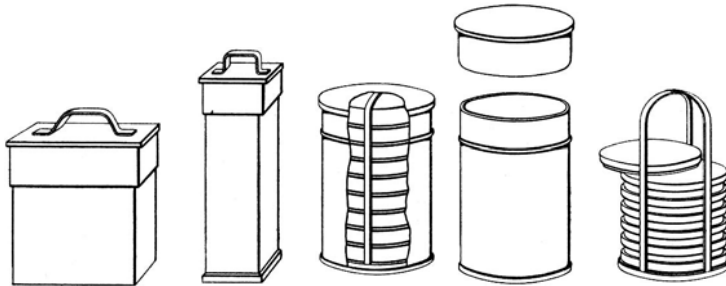


Abb. 10. Blechbüchsen zum Sterilisieren von Pipetten, Glasstäben, Glasschalen in heißer Luft.

einen sorgfältig anliegenden Wattestopfen verschlossen, so daß der Dampf den Stopfen längere Zeit durchströmt. Beim Erkalten der Flüssigkeit wirkt der Wattestopfen als Filter, das die Luftkeime zurückhält.

Bequemer und sicherer in der Wirkung als dieses Kochen über der Flamme ist das Sterilisieren im strömenden Dampf. Nach EYKMAN wirkt übrigens Dampf energischer als Wasser gleicher Temperatur. Für das Erhitzen im strömenden Dampf sind verschiedene Apparate, sog. Dampftöpfe, hergestellt worden, von denen der verbreitetste der KOCHSche Dampftopf ist. In ihnen wird Wasser zum Kochen erhitzt, wobei der Dampf durch einen geräumigen

Aufsatz streicht, der zur Aufnahme der zu sterilisierenden Gegenstände bestimmt ist (Abb. 11).

Strömender Wasserdampf genügt bei genügend langer Einwirkung zur Abtötung der vegetativen Formen und Dauerformen der Eumyceten und einer großen Zahl von Bakterienarten. Im allgemeinen ist eine halbstündige Sterilisierung bei 100° ausreichend. Nur zur Sterilisierung größerer Flüssigkeitsmengen (mehr als 250 ccm) muß man entsprechend länger erhitzen, um zum Ziele zu gelangen. Wichtig ist es dabei, daß der Dampf gesättigt ist, d. h. daß die Luft nach Möglichkeit entfernt ist, da ungesättigter Dampf ebenso unsicher wirkt wie trockene Hitze.

Im Erdboden und in vielen natürlichen Substraten (z. B. in Milch) kommen jedoch immer Dauerformen bestimmter Bakterienarten vor, die auch durch mehrstündiges Verweilen in gesättigtem Dampf von 100° nicht getötet werden. Um diese zu beseitigen, wendet man die sog. diskontinuierliche (fraktionierte) Sterilisierung oder die Sterilisation mit gespanntem Dampf an.

Die diskontinuierliche Sterilisierung besteht in wiederholter kurzer Erhitzung des Gegenstandes in strömendem Wasserdampf mit 24stündigen Pausen. Meist wird die Erhitzung an aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Die diskontinuierliche Sterilisierung wird nur bei solchen Nährböden vorgenommen, die durch höhere Temperaturen schädliche Veränderungen erleiden, wie z. B. Gelatine, die jedesmal nicht länger als 20 Minuten erhitzt werden soll. Man geht bei dieser Art der Sterilisierung von dem Gedanken aus, daß die bei der ersten Erhitzung auf 100° nicht getöteten Sporen zum Teil innerhalb der nächsten 24 Stunden keimen und die nunmehr vorhandenen vegetativen Formen bei der zweiten Sterilisierung getötet werden. Durch öftere Wiederholung dieses Vorganges hofft man zu völliger Keimfreiheit zu gelangen. In Wirklichkeit sind die Erfolge der diskontinuierlichen Sterilisierung unsicher, da die Sporenkeimung sehr unregelmäßig erfolgt.

Die Sterilisierung mit gespanntem Dampf führt überall zum Ziele, wo Veränderungen der sterilisierten Stoffe durch die hohen Temperaturen nicht zu befürchten sind. Es genügt im allgemeinen eine halbstündige Erhitzung auf etwa 112° (= 0,5 Atmosphären Überdruck) oder eine 20 Minuten dauernde auf etwa 120° (= 1 Atmosphäre Überdruck), um auch die widerstandsfähigsten Sporen in nicht zu großen Flüssigkeitsmengen sicher zu töten. Für die Sterilisierung mit gespanntem Dampf benutzt man Autoklaven.

Die Autoklaven bestehen aus dem Kochgefäß und Deckel, der durch einen Bügel oder mit Flügelschrauben vollkommen dampfdicht aufgedrückt wird. Das Manometer besitzt eine automatische Regelungsvorrichtung für die Gaszufuhr, so daß nach der Einstellung eines Zeigers auf den gewünschten Druck keine weitere Kontrolle nötig ist. Es ist jedoch stets erforderlich, die Anzeige des Manometers durch Temperaturmessung zu kontrollieren. Zu beachten ist weiter, daß der Kochtopf genug Wasser enthält und daß das Auspuffventil erst geschlossen wird, wenn sämtliche Luft aus dem Apparat ausgetrieben ist, was sich durch einen Dampfstrom kundgibt, der durch Luftblasen nicht unterbrochen wird. Ein Sicherheitsventil im Deckel schließt die Überhitzung auch beim Versagen der automatischen Gaszufuhr aus. Nach dem Sterilisieren läßt

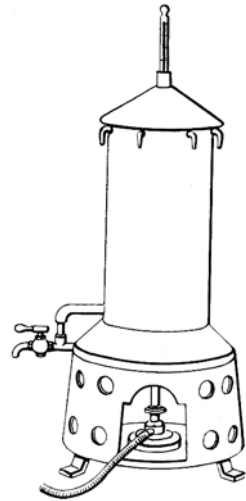


Abb. 11.  
Kochscher Dampftopf in  
verbesselter Form.

man den Autoklaven abkühlen, bis der Überdruck verschwunden ist. Bei früherem Öffnen würden die Flüssigkeiten infolge der Überhitzung aus den Gefäßen herausschäumen. Da beim Anwärmen des Autoklaven zunächst Kondenswasser vom Deckel und den Wänden herabrinnt, so sollen die Wattedropfen der Gefäße die Wandung des Autoklaven nicht berühren. Auch kann man die Stopfen durch Glaskappen schützen. Sowohl für die Autoklaven wie für gewöhnliche Dampftöpfe werden von den Firmen Einsatzkörbe aus Drahtgeflecht (Abb. 12) geliefert, die man nach dem Sterilisieren mit dem Inhalt herausnimmt.

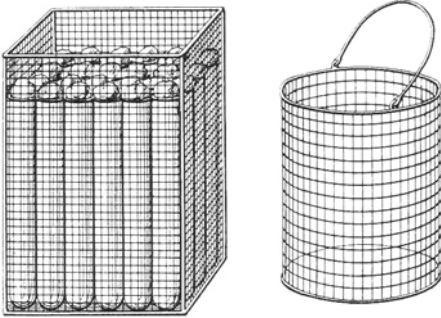


Abb. 12. Drahtkörbe zum Einsetzen in Dampfsterilisierapparate.

Chemikalien werden bei mykologischen Arbeiten seltener zum Sterilisieren benutzt. Für Metallgeräte, wie Stahlnadeln u. dgl., die dem Erhitzen nicht ausgesetzt werden dürfen, um die Oberfläche nicht rau zu machen, empfiehlt O. BREFELD Eintauchen in Alkohol. Auch größere Deckgläser, die beim Erhitzen springen würden, kann man durch Einlegen in Alkohol sterilisieren, den man dann über der Flamme verdunsten läßt. Sollen größere Gefäße, die das Erhitzen nicht vertragen, sterilisiert werden, so spült man sie nach gründlicher mechanischer Reinigung

mit wäßriger Sublimatlösung (1:1000) oder 1%iger Formaldehydlösung (das Formalin des Handels enthält etwa 40% Formaldehyd) oder mit 3%igem Wasserstoffsperoxyd längere Zeit aus und spült dann mehrere Male mit sterilisiertem Wasser nach.

Erscheint die Keimfreimachung der Hände des Mykologen erwünscht, so ist hierfür ebenfalls Sublimatlösung 1:1000 oder 70%iger Alkohol zu empfehlen.

Chemikalien kommen auch bei der Sterilisierung der Oberfläche fester Stoffe in Betracht, deren innere Teile auf Keime untersucht werden sollen. In diesen Fällen hat der chemischen Sterilisierung die gründlichste mechanische Reinigung mit Bürste und fließendem Wasser voranzugehen, um möglichst viele Keime zu entfernen. Sämereien müssen wiederholt mit fließendem Wasser abgespült werden. Dann werden die Gegenstände  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde in Sublimat (1 $^{\circ}$ / $_{00}$ ) oder Formaldehydlösung (1%) gelegt und darauf mit sterilisiertem Wasser mehrmals abgewaschen.

Abb. 13. Filtrierapparat nach REICHEL. *B* Tonkerze, die mit glattgeschliffenem Rand auf dem ebenfalls geschliffenen Rand des Glasgefäßes *A* aufliegt. *c* Ansatz für die Saugpumpe, *d* Ausguß für das Filtrat. Der ganze Apparat kann im Zusammenhang sterilisiert werden.

Will man in Kulturen die Keime abtöten, die Enzyme dagegen wirksam erhalten, so empfiehlt es sich, die Kultur mit einigen Tropfen Chloroform tüchtig durchzuschütteln. Auch Sublimat und Formalin eignen sich unter Umständen für diesen Zweck, sie schädigen aber im allgemeinen Enzyme viel leichter als Chloroform.

Durch Filtration sterilisiert man nur solche flüssige Nährböden, die durch andere Verfahren, besonders durch Erwärmen, chemisch zu sehr verändert werden (z. B. Serum), oder flüssige Kulturen, in denen man die

Bakterienleiber von Excreten oder Sekreten, besonders Enzymen oder Toxinen trennen will. Als Filter werden für kleinere Flüssigkeitsmengen vorzugsweise die Filterkerzen, d. h. an einer Seite geschlossene Zylinder aus gebrannter Porzellanerde (CHAMBERLAND-Filter) oder gepreßter Kieselgur (BERKEFELD-Filter) verwendet. Die Flüssigkeit wird durch diese Kerzen unter erhöhtem oder vermindertem Druck gepreßt oder gesaugt (Abb. 13). Jede Filterkerze wird vor der Ingebrauchnahme auf etwaige Risse in der Weise geprüft, daß man sie in Wasser stellt und Luft hineinpreßt. Es darf dann nirgends ein Luftstrom aufsteigen. Die ersten durch ein Filter gehenden Teile der Flüssigkeit sind stets keimhaltig, bei längerer Dauer der Filtration zuweilen auch die letzten, weil inzwischen Bakterien durch die Filterporen hindurchgewachsen sein können. Zu beachten ist ferner, daß die Filtermassen auch Eiweiß und eiweißartige Stoffe (Enzyme, Toxine) leicht in größerer Menge zurückhalten, so daß das Filtrat von ihnen weniger enthält als die ursprüngliche Flüssigkeit. (Letzteres ist in noch höherem Grade der Fall, wenn an Stelle von Kerzen, sog. Ultrafilter Verwendung finden, um submikroskopische Keime zurückzuhalten.)

Nach dem Gebrauch müssen die Kerzen zunächst durch Abbürsten, dann durch Erhitzen im Dampftopf sterilisiert werden. Brauchbar sind auch selbst hergestellte Asbestfilter nach HEIM<sup>1</sup>.

Die Entkeimung durch ultraviolette Strahlen (Quarzlampe) hat für mykologische Laboratorien vorläufig keine praktische Bedeutung.

Als partielle Sterilisation sei hier noch das Pasteurisieren erwähnt, das in einmaligem Erwärmen auf Temperaturen unter 100° mit nachfolgendem Abkühlen besteht. Hierbei wird die Zahl der vegetativen Formen je nach der verwendeten Temperatur und Zeitdauer mehr oder weniger zurückgedrängt.

### III. Nährböden.

Die Ansprüche der verschiedenen Eumyceten- und Bakterienarten an die Nährstoffe für Assimilation (Aufbau der Leibesmasse) und Dissimilation (Betriebsstoffwechsel, Zersetzungs- und Abbauerscheinungen) sind sehr verschieden. Als autotroph bezeichnet man solche Arten, die sich (wie die höheren Pflanzen) aus anorganischem Material ernähren können. Von den Elementen sind für die Ernährung der Pilze nach den bisherigen Erfahrungen unbedingt nötig Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphor, Kalium, Magnesium, auch Eisen scheint unersetzlich. Natrium, Calcium u. a. können dagegen anscheinend in manchen Fällen entbehrt werden. Salze werden den Nährböden im allgemeinen in löslicher Form zugesetzt. Vom Kalium kommen sowohl die anorganischen wie die organischen Salze, vom Magnesium meist das Sulfat in Betracht. Schwefel wird meist als Sulfat verwendet, seltener in Form anderer Verbindungen. Phosphor wird gewöhnlich in Form von Orthophosphaten, seltener Meta- und Pyrophosphaten oder organischen Verbindungen geboten. Die größte Mannigfaltigkeit herrscht in bezug auf die Stickstoffquellen.

Nach BEYERINCK und JOST kann man die Pilze nach ihrem Vermögen zur Ausnutzung der Stickstoffquellen in folgende Gruppen teilen:

1. Nitrogene Pilze, die den elementaren Stickstoff verwerten;
2. Ammon-Nitrit-Nitratpilze, die entweder vollständig auf diese Stickstoffquellen angewiesen oder doch imstande sind, auch sie zu verwerten;
3. Amin- und Peptonpilze, die auf organische Stickstoffverbindungen angewiesen sind.

<sup>1</sup> HEIM: Zentralbl. Bakteriolog. I, Ref. 1905, 38, Beih., S. 52.

Den Bedarf an Kohlenstoff decken nur wenige Pilzarten aus der Kohlen-säure, die überwiegende Zahl aus organischen Kohlenstoffverbindungen. Die wichtigsten Kohlenstoffquellen sind die Kohlenhydrate, die mehrwertigen Alkohole, besonders Glycerin und Mannit und viele organische Säuren.

Alle Nährstoffe müssen in gelöster oder in einer durch die Pilze in Lösung überführbaren Form gegeben werden. Bezüglich der Konzentration der Lösungen sind die Pilze im allgemeinen nicht sehr empfindlich, doch kommen in dieser Beziehung sehr große Schwankungen, und zwar nicht nur bei verschiedenen Arten, sondern auch bei derselben Art auf verschiedenen Nährböden vor.

Bezüglich des für die Entwicklung von Bakterien nötigen Wassergehaltes der Nährböden gehen die Angaben auseinander.

Nach WOLF<sup>1</sup> und JORNS<sup>2</sup> soll das Wachstum schon bei 40% Wasser aufhören. Doch ist zweifellos die Art des Nährbodens von großem Einfluß, denn nach den von KÖNIG und SPIECKERMANN an verschiedenen fetthaltigen Futtermehlen ausgeführten Versuchen beginnt dort das Bakterienwachstum schon bei einem Wassergehalt von 30%. Schimmelpilze sind weniger anspruchsvoll, *Eurotium repens* gedeiht schon bei 14%, *Penicillium glaucum* bei 25% Wasser.

Was die Reaktion der Nährböden betrifft, so sind die Bakterien meist für neutrale und schwach alkalische Reaktion dankbar, während die Eumyceten schwach saure Reaktion vorziehen. Indessen erleidet diese Regel zahlreiche Einschränkungen, und es muß bei Züchtungs- und Ernährungsversuchen hierauf sorgfältig Rücksicht genommen werden. Für manche Zwecke ist es unerlässlich, die Reaktion des Nährbodens genauer einzustellen. Dies geschieht am besten durch Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration nach MICHAELIS mit Hilfe des Komparators.  $p_H$ -Werte zwischen 7,2 und 7,5 geben nach LEHMANN-NEUMANN für die meisten Bakterien gute Wachstumsbedingungen, jedoch ist der Optimalwert für jeden Organismus ein anderer. Zum Ansäuern der Nährböden werden meist organische Säuren, und zwar Milch-, Äpfel-, Wein- oder Citronensäure verwendet.

Die Zusammensetzung und Herstellung von Nährböden wechselt sehr nach den Zwecken, denen sie dienen sollen. Kommt es darauf an, Pilze in Reinzuchten zu gewinnen, ihren Entwicklungsgang festzustellen oder Massenkulturen zu erzeugen, so wird man meist mit Vorteil Nährböden verwenden, die in ihrer Zusammensetzung und Struktur den natürlichen Standortverhältnissen möglichst angepaßt sind. Solche Nährböden können unveränderte sterilisierte Rohstoffe der Natur oder Erzeugnisse aus solchen sein.

Auf eine genaue Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der Nährböden wird man in diesen Fällen verzichten können. Soll aber das Nährstoffbedürfnis eines Pilzes festgestellt werden, so ist es unerlässlich, mit Nährböden zu arbeiten, deren Zusammensetzung qualitativ und quantitativ genau bekannt ist und die aus möglichst chemisch reinen Stoffen hergestellt sind. Selbst der Einfluß des destillierten Wassers und der Laboratoriumsluft darf hierbei nicht vernachlässigt werden.

Im folgenden sollen zunächst die wichtigsten gebräuchlichen Nährböden unter besonderer Berücksichtigung der Ziele dieses Werkes aufgezählt werden, deren Zusammensetzung einen Fingerzeig für Konzentration u. a. m. bei der Aufstellung eigener Vorschriften geben kann. Anschließend folgen dann noch einige Bemerkungen über das Abfüllen und Aufbewahren sowie über die Brauchbarkeit der Nährböden für verschiedene Zwecke der Kultur.

<sup>1</sup> WOLF: Arch. Hygiene 1899, 34, 200.

<sup>2</sup> JORNS: Arch. Hygiene 1907, 63, 123.

## A. Zusammensetzung und Herstellung der wichtigsten Nährböden.

### a) Nährböden mit organischen Stoffen.

1. Fleischwasser. Fleischwasser ist die Grundlage der wichtigsten Bakteriennährböden. 500 g fein gehacktes fettfreies Rind- oder Pferdefleisch werden mit 1 l Wasser  $\frac{1}{2}$  Stunde gekocht. Hiernach läßt man erkalten, damit noch vorhandenes Fett erstarrt, kocht und filtriert in Kolben mit Watteverschluß, füllt auf 1000 ccm auf und sterilisiert, sofern das Fleischwasser nicht sofort weiter verarbeitet werden soll,  $\frac{1}{4}$  Stunde bei 125° im Autoklaven. Fleischwasser ist das Ausgangsmaterial für Nährbouillon, Nährgelatine und Nähragar.

Soll das Fleischwasser für sich als Nährboden verwendet werden, so wird es je nach dem Zweck gegebenenfalls noch neutralisiert. Dies geschieht in der Weise, daß die kochendheiße Flüssigkeit tropfenweise mit 10%iger Sodalösung oder 25%iger Natronlauge versetzt wird, bis blaues Lackmuspapier nicht mehr gerötet und rotes schwach gebläut wird. Einen etwaigen zu großen Alkaliüberschuß beseitigt man durch Phosphorsäure.

Nach dem Neutralisieren muß das Fleischwasser meist nochmals filtriert werden. Darauf wird es im Autoklaven sterilisiert. Statt Fleischwasser wird auch eine 1—2%ige Fleischextraktlösung verwendet, die aber dem Fleischwasser nicht gleichwertig ist. Fleischextraktlösungen müssen, da das Extrakt sehr widerstandsfähige Bakteriensporen enthält, ebenfalls im Autoklaven sterilisiert werden.

2. Nährbouillon. Fleischwasser wird mit 1% Pepton „WITTE“ und 0,5% Kochsalz versetzt, bis zur Lösung desselben im Dampftopf erhitzt, heiß neutralisiert bis zum Lackmusneutralpunkt, filtriert und im Autoklaven sterilisiert. Zuweilen wird noch vor dem letzten Sterilisieren 1% Glucose zugegeben. Bouillon aus Fleischextrakt wird in derselben Weise hergestellt.

3. Peptonwasser. 10 g Pepton und 5 g Kochsalz werden in 1 l Wasser gelöst und sterilisiert. In Peptonwasser erzeugen manche Bakterienarten Indol.

4. HEYDEN-Nährstoffbouillon. 5 g Nährstoff HEYDEN, 5 g Kochsalz, 30 g Glycerin, 1000 ccm Wasser, die Lösung wird mit Natriumcarbonat neutralisiert und dann sterilisiert.

5. Milch. Frische Milch (oder Magermilch) wird in Reagensgläsern entweder 3—5 Tage hintereinander je 20 Minuten im Dampftopf oder einmal 15 Minuten im Autoklaven bei 105° sterilisiert. Temperaturen über 110° färben die Milch bräunlich. Vor der Verwendung läßt man die Röhren 3 Tage im Brutschrank stehen, um ihre Sterilität zu prüfen. Milch ist ein guter Nährboden für die meisten Bakterien und Eumyceten.

6. Molke. Für bestimmte Bakterien (z. B. Milchkakterien) verwendet man zu Kulturzwecken auch das Milchserum allein, das man folgendermaßen herstellt: Man erwärmt Magermilch auf 40° C und setzt vorsichtig 1%ige Salzsäure zu, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Hierauf filtriert man und neutralisiert mit sehr verdünnter Natronlauge (Lackmus). Dann erhitzt man im Dampftopf 45 Minuten und filtriert vom etwa entstehenden Niederschlag ab. Die fertige Molke muß in dünner Schicht klar erscheinen. Nach der üblichen Sterilisierung wird sie entweder unmittelbar als Nährboden verwendet oder mit anderen Stoffen (Gelatine, Agar) kombiniert.

7. Bierwürze. Gehopfte und nicht gehopfte Würze wird, ohne sie zu neutralisieren, durch Erhitzen im Dampftopf sterilisiert. Sie ist vorzüglich geeignet zur Kultur vieler höheren Pilze und bildet die Grundlage für verschiedene feste Nährböden.

8. Heuabkochung. 10 g Heu werden mit 0,5 l Wasser einige Stunden stehen gelassen, dann 10—15 Minuten gekocht. Das Filtrat wird je nach dem



Zweck neutralisiert (für Bakterien) oder sauer gelassen (für höhere Pilze). Es muß wegen seines Gehaltes an sehr widerstandsfähigen Sporen  $\frac{1}{2}$  Stunde im Autoklaven bei 1 Atmosphäre Überdruck sterilisiert werden.

9. Pflaumen-, Rosinen- und Birnenwasser. 100 g Backpflaumen, Rosinen oder gedörrte Birnen werden in 1 l Wasser 24 Stunden eingeweicht. Das abgepreßte Filtrat wird gekocht, filtriert, sterilisiert. Diese Abkochungen sind ein guter Nährboden für höhere Pilze. Auch die gedörrten Früchte selbst, mit Wasser eingeweicht und in Doppelschalen sterilisiert, sind als Nährböden für Massenkulturen vorzüglich geeignet. Ebenso eignen sich auch frische, süße Früchte, aus denen Teile aseptisch entnommen werden, vorzüglich für Pilzkulturen. O. BREFELD empfiehlt besonders Bananen.

10. Traubenmost. Traubenmost wird sterilisiert. Man kann auch den käuflichen konzentrierten Most mit 3 Teilen Wasser verdünnen und sterilisieren. Er ist ein guter Nährboden für höhere Pilze.

11. Hefewasser. 250 g Preßhefe werden mit 1 l Wasser  $\frac{1}{2}$  Stunde lang gekocht, worauf noch heiß filtriert wird. Das Filtrat wird mit 1 l Wasser verdünnt, wieder  $\frac{1}{2}$  Stunde gekocht, filtriert und im strömenden Dampf sterilisiert. Hefenwasser ist ein guter Nährboden für Bakterien und höhere Pilze.

12. Kartoffeln, Möhren, Rüben. Von den verschiedenen Formen, in denen Kartoffeln als Nährböden verwendet werden, ist die geeignetste die nach GLOBIG. Man sticht aus sauber gewaschenen und gebürsteten, dann  $\frac{1}{2}$  Stunde in 1 $\frac{0}{100}$ iger Sublimatlösung sterilisierten Kartoffeln mit Korkbohrern Zylinder heraus, halbiert sie durch einen schrägen Längsschnitt, so daß zwei Keile entstehen und legt diese in Röhrchen, in denen sich unten ein kleiner Bausch feuchter Watte befindet. Sterilisiert wird  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 1 Atmosphäre Überdruck. Hat man fraktioniert im strömenden Dampf sterilisiert, so ist danach 24stündige Bebrütung erforderlich, um etwa noch keimhaltige Röhrchen aussondern zu können.

Man kann auch die gereinigten und geschälten Kartoffeln mit dem Messer in Scheiben zerlegen und diese in Glasdosen sterilisieren. Möhren, Rüben, auch Kohlrabi, Sellerie, werden in derselben Weise hergerichtet.

13. Mist der Kräuterfresser. Für alle höheren Pilze empfiehlt O. BREFELD Mist der Kräuterfresser (insbesondere vom Pferd), und Abkochungen davon als vorzüglichen Nährboden. Man erwärmt Pferdemist, mit Wasser zu einem dicken Brei angerührt, im Dampftopf 1 Stunde lang auf 80—90°, filtriert die erkaltete Masse und sterilisiert wiederholt bei 80—100°. Diese Abkochung kann auch in konzentrierter Form aufbewahrt und zum Gebrauch mit der 8—10fachen Menge Wasser verdünnt werden. Den Mangel der Mistlösung an Kohlenhydraten kann man durch Zusatz von Zucker oder durch Verdünnung mit Fruchtsäften beseitigen.

Mist selbst wird in mäßig feuchtem Zustande in Doppelschalen sterilisiert.

14. Brot. Brot ist ein vorzüglicher Nährboden für viele höhere Pilze. O. BREFELD empfiehlt, ein nicht zu saures Brot in Scheiben zu schneiden, mäßig mit Wasser oder Nährlösungen (Würze, Fruchtsäften, Mistabkochung u. a.) zu befeuchten und etwa 4—5mal in Abständen von 2—3 Tagen bei 56—60° zu sterilisieren.

15. Weiße Oblaten sind nach SCHILL ein guter Nährboden für Farbstoffbildner. Man legt sie in Doppelschalen, befeuchtet mit Nährflüssigkeit und sterilisiert.

16. In Sägespäne aufgesaugte Nährlösungen. Solche Nährböden empfiehlt O. BREFELD als ausgezeichnet für die Kultur vieler höherer Pilze. Die Sägespäne werden mit Wasser angefeuchtet, wiederholt 1 Stunde bei 100° sterilisiert und dann mit den sterilen Nährlösungen befeuchtet.

17. Gelatinierende Nährböden. Mit Hilfe von Gelatine und Agar lassen sich sämtliche Nährflüssigkeiten in feste Nährböden verwandeln, die wegen ihrer Eigenschaften besonders für die Bakterienkultur besondere Bedeutung erlangt haben.

#### Gelatinenährböden.

Nährböden, die mit Hilfe von Gelatine hergestellt sind, spielen bei der Kultur der Bakterien und Eumyceten eine Hauptrolle. Diese Nährböden sind durchsichtig, schmelzen bei niedriger Temperatur, geben sehr kennzeichnende Wachstumserscheinungen bei vielen Pilzen und lassen sich in ihrer Zusammensetzung ohne Schwierigkeit weitgehend variieren. Ihre Eigenschaft, durch proteolytische Enzyme verflüssigt zu werden, ist für die Differentialdiagnose sehr wertvoll, andererseits bei Reinzüchtungen aus Mischkulturen störend, wenn stark verflüssigende Arten in größerer Zahl vorhanden sind. Der niedrige Schmelzpunkt der Gelatinenährböden verhindert ihre Anwendung bei Bruttemperatur. Derartige Kulturen werden deshalb bei Zimmertemperatur oder am besten im Kulturschrank bei 22° C gehalten.

Die gebräuchlichsten Gelatinenährböden sind folgende:

Fleischwasser-Pepton-Gelatine (Nährgelatine). In Fleischwasser werden 1% Pepton „WITTE“ und 10% feinste weiße Gelatine (möglichst frei von SO<sub>2</sub>) durch Erwärmung im Dampftopf gelöst. Dann wird neutralisiert (bis Lackmus ganz schwach alkalische Reaktion zeigt) und der auf etwa 50° abgekühlten Flüssigkeit das in wenig Wasser verrührte Weiße eines Eies zugesetzt, hierauf 10 Minuten im Dampftopf erhitzt, durch einen mit einem Faltenfilter beschickten Heißwassertrichter (Abb. 14) in Kolben filtriert und unter Watteverschluß nochmals 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Gelatine ist gegen häufiges und starkes Erhitzen sehr empfindlich und büßt leicht ihr Erstarrungsvermögen ein. Erhitzen im Autoklaven ist daher zu vermeiden.

Diese Nährgelatine ist der häufigst verwendete Nährboden für Bakterien. Sie schmilzt bei etwa 25°, erstarrt bei Temperaturen unter 20° schnell (im Sommer sind statt 10% Gelatine 15% zu verwenden) und ist bei richtiger Herstellung völlig durchsichtig. Viele Bakterienarten wachsen auf ihr in sehr kennzeichnender Weise.

Statt Fleischwasser kann auch eine 1—2%ige Lösung von Fleischextrakt verwendet werden. Über Nährgelatine für Wasseruntersuchungen vgl. unter „Wasser“.

Würzgelatine. In gehopfter oder ungehopfter Bierwürze werden 8—10% Gelatine gelöst. Der Nährboden ist nach 1/2stündiger Sterilisierung im Dampftopf fertig. Er eignet sich ausgezeichnet für viele höhere Pilze, insbesondere für Hefen. Nicht neutralisieren.

Bei Verarbeitung sonstiger Nährlösungen zu Gelatinenährböden ist stets die Reaktion zu beachten. Reine Gelatinelösungen reagieren sauer. Die gewünschte Reaktion ist durch Alkali oder organische Säuren herzustellen.

#### Agarnährböden.

Der aus verschiedenen Meeresalgen gewonnene Agar-Agar gibt in 1—2%igen Lösungen ebenfalls ziemlich durchsichtige Nährböden, die vor den Gelatinen den Vorzug haben, daß sie bei Brutwärme noch festbleiben und daher zur

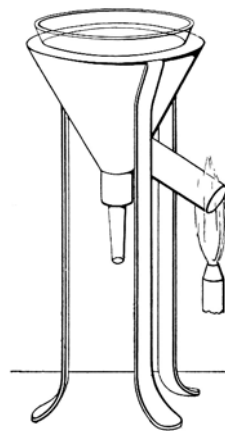


Abb. 14.  
Heißwassertrichter.

schnellen Züchtung vieler Bakterienarten sehr geeignet sind. Dem steht allerdings der Nachteil gegenüber, daß die Agarnährböden erst bei etwa 100° flüssig werden und schon bei 40° erstarren, so daß bei Anlage von Plattenkulturen vorsichtiges und schnelles Arbeiten nötig ist, wenn nicht die Pilzkeime durch zu starke Erwärmung leiden oder die Nährböden vorzeitig fest werden sollen. Wenig angenehm ist auch die Eigenschaft des Nähragars, nach dem Erstarren Wasser austreten zu lassen, so daß auf Plattenkulturen leicht sehr ausgedehnte oberflächliche Bakterienwucherungen entstehen. Man legt deshalb die Agarplatten umgekehrt in den Brutschrank (Boden nach oben), um eine Abscheidung von Kondenswasser am Deckel zu verhüten. Auch wachsen Bakterien im allgemeinen auf Agarnährböden nicht in so kennzeichnender Weise wie auf Nährgelatine. Trotzdem sind die Agarnährböden wegen ihrer sonstigen vorzüglichen Eigenschaften hochgeschätzt und werden nächst den Gelatinenährböden am häufigsten verwendet.

Die gebräuchlichsten Agarnährböden sind folgende:

**Fleischwasser-Pepton-Agar.** 1—2% Agar (klein geschnitten oder als Pulver) werden in einem Emailletpf mit Fleischwasser an einem kühlen Ort zum Quellen einige Stunden stehen gelassen. Dann wird  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunde über freiem Feuer unter Umrühren und Ersatz des verdampfenden Wassers gekocht, oder  $\frac{1}{2}$  Stunde im Autoklaven bei 0,6—0,8 Atmosphären Überdruck erhitzt, 1% Pepton in der Flüssigkeit gelöst, neutralisiert und im Dampftopf mit Hilfe eines Emailletrichters durch ein doppeltes Faltenfilter filtriert. Die Filtration des Agars geht sehr langsam vor sich. Will man das langwierige Filtrieren vermeiden, so läßt man den Agar nach dem Sterilisieren im Autoklaven langsam erkalten und schneidet die untere Schicht, die das Sediment enthält, fort.

Pepton-Fleischwasseragar kann durch verschiedene Zusätze noch brauchbarer gemacht werden. Häufig mischt man ihm 5% Glycerin bei. Auch Glucose oder Lactose wird in vielen Fällen zugesetzt (meist 2%).

Statt Fleischwasser wird auch eine 1—2%ige Fleischextraktlösung benutzt.

**HEYDEN-Nährstoffagar.** Ein Nähragar, der vielfach für Zählplatten benutzt wird, ist der HEYDEN-Nährstoffagar nach HESSE und NIEDNER. 8 g Nährstoff HEYDEN, 13 g Agar werden mit 1 l Wasser im Autoklaven bei 125° 8 Minuten erhitzt. Der Agar wird im Dampftopf filtriert und nochmals 8 Minuten im Autoklaven sterilisiert. ARTH. MEYER empfiehlt noch einen Zusatz von 20 g Glucose.

Würzeagar wird durch Auflösen von 20 g Agar in 1 l Bierwürze erhalten.

Der Agar darf nicht zu lange im Autoklaven erhitzt werden, da er sonst sehr weich wird. Es genügt, ihn 10 Minuten bei etwa 110° darin zu lassen. Würzeagar ist ein vorzüglicher Nährboden für Massenkulturen vieler höherer Pilze.

Milchagar stellt man in der Weise her, daß man verflüssigtem Fleischwasserpeptonagar etwa 10—12% entrahmte, sterilisierte Milch unmittelbar vor dem Gebrauch zusetzt. Er dient unter anderem zur Erkennung peptonisierender Bakterien, die das Casein auflösen (heller Hof).

Molkenagar bereitet man mit der obenerwähnten Molke. Er eignet sich besonders zur Kultur von Milchbakterien.

Spezialagarnährböden für diagnostische Zwecke gibt es eine große Anzahl. Viele von ihnen werden unter Zusatz von Farbstoffen bereitet und finden z. B. für die Charakterisierung der Bakterien der Coli-Typhusgruppe ausgedehnteste Verwendung. Näheres hierüber wird bei den Abschnitten Milch, Fleisch und Wasser ausgeführt werden.

Auch Elektivnährböden, auf denen nur bestimmte Arten zur Entwicklung gelangen, werden meist mit Agar bereitet.

18. Trockennährböden nach DOERR. Es sind unbegrenzt haltbare Nährböden in Pulver- oder Tablettenform, die durch Auflösung in kochendem Wasser in kurzer Zeit gebrauchsfertig sind. Hersteller z. B. Chemische Fabrik „Bram“ in Leipzig.

19. Eiweißfreie Nährlösungen bestimmter Zusammensetzung.

a) Lösung nach USCHINSKI:

|                        |         |                                   |           |
|------------------------|---------|-----------------------------------|-----------|
| Wasser . . . . .       | 1000 g  | Magnesiumsulfat . . . . .         | 0,2—0,4 g |
| Glycerin . . . . .     | 30—40 g | Dikaliumphosphat . . . . .        | 2,5—3,0 g |
| Chlornatrium . . . . . | 5—7 g   | Ammoniumlactat . . . . .          | 6—7 g     |
| Chlorcalcium . . . . . | 0,1 g   | Asparaginsaures Natrium . . . . . | 3—4 g     |

b) Normallösung nach MAASSEN:

|                           |        |                                  |  |        |
|---------------------------|--------|----------------------------------|--|--------|
| Wasser . . . . .          | 1000 g | } mit Kalilauge<br>neutralisiert | Magnesiumsulfat . . . . .                  | 0,40 g |
| Apfelsäure . . . . .      | 7 g    |                                  | Dikaliumphosphat . . . . .                 | 0,20 g |
| Dazu: Asparagin . . . . . | 10 g   |                                  | Krystallisiertes Natriumcarbonat . . . . . | 2,50 g |
|                           |        |                                  | Wasserfreies Calciumchlorid . . . . .      | 0,01 g |

Je nach Bedarf werden 15—40 Teile Glycerin, Mannit, Dulcit oder verschiedene Zucker zugesetzt.

c) Lösung zur Züchtung denitrifizierender Bakterien nach GILTAY:

|                              |        |                             |       |
|------------------------------|--------|-----------------------------|-------|
| Wasser . . . . .             | 1000 g | Dinatriumphosphat . . . . . | 2,0 g |
| Glucose . . . . .            | 2 g    | Magnesiumsulfat . . . . .   | 2,0 g |
| Citronensäure . . . . .      | 5 g    | Chlorcalcium . . . . .      | 0,2 g |
| Kaliumnitrat . . . . .       | 2 g    | Eisenchlorid . . . . .      | Spur  |
| Monokaliumphosphat . . . . . | 2 g    |                             |       |

In dieser Lösung können auch die organischen Stoffe durch andere Zucker, mehrwertige Alkohole und Säuren ersetzt werden. Die Isolierung der Organismen erfolgt durch Gelatinenährböden.

d) Lösungen nach ARTH. MEYER<sup>1</sup>. Auf diese für differentialdiagnostische Zwecke bestimmten Lösungen, die ARTH. MEYER nach ihrer Zusammensetzung trennt in

1. gut kontrollierbare, konstante Nährlösungen,

2. wegen des Gehaltes an unbestimmten Nährsubstanzen nicht genau kontrollierbare Lösungen,  
soll hier nur hingewiesen werden.

e) Nährlösung für Hefe nach HAYDUCK. Sie enthält im Liter 100 g Saccharose, 2,5 g Asparagin und 20 ccm mineralischer Nährlösung. Letztere enthält im Liter 50 g Monokaliumphosphat und 17 g Magnesiumsulfat. Ist das verwendete Leitungswasser nicht kalkhaltig, so gibt man 0,1 g Calciumchlorid hinzu.

### b) Nährböden ohne organische Stoffe.

1. Mineralische Lösung nach ARTH. MEYER. Sie enthält in 1 l Wasser: 1 g primäres Kaliumphosphat, 0,1 g Calciumchlorid, 0,3 g Magnesiumsulfat, 0,1 g Natriumchlorid und 0,01 g Ferrichlorid.

Weitere Nährböden ohne organische Stoffe kommen nur für die Züchtung weniger Bakterienarten, nämlich für solche, die Ammonsalze zu Nitriten (Nitritbakterien) und diese zu Nitraten (Nitratbakterien) oxydieren<sup>2</sup>, in Betracht.

2. Nährböden für Nitritbakterien. a) Nährlösung zum Anreichern der Nitritbakterien nach WINOGRADSKI:

|                          |        |                           |       |
|--------------------------|--------|---------------------------|-------|
| Wasser . . . . .         | 1000 g | Kaliumphosphat . . . . .  | 1,0 g |
| Ammoniumsulfat . . . . . | 2 g    | Magnesiumsulfat . . . . . | 0,5 g |
| Natriumchlorid . . . . . | 2 g    | Ferrosulfat . . . . .     | 0,4 g |

<sup>1</sup> Vgl. ARTH. MEYER: Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903.

<sup>2</sup> Hauptsächlichste Literatur: WINOGRADSKI: Ann. Inst. Pasteur 4, 5. — OMELJANSKI: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1896, 2, 425; 1899, 5, 537, 652.

b) Nähr-Kieselgallerte nach KÜHNE zur Isolierung der Bakterien aus den angereicherten flüssigen Kulturen. Die Kieselsäurelösung stellt man nach KÜHNE in der Weise her, daß man 1 Volumen reines Kali- oder Natronwasserglas vom spezifischen Gewicht 1,05—1,06 mit 1 Volumen Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,10 allmählich mischt und darauf in Pergamentschläuchen 1 Tag gegen fließendes Leitungswasser und dann 1 Tag gegen wiederholt gewechseltes destilliertes Wasser bis zum Verschwinden der Salzsäurereaktion dialysiert. Die Lösung wird bei 115—120° sterilisiert. 50 ccm davon werden mit 2,5 ccm einer wäßrigen Lösung von 1‰ Kaliumphosphat, 3‰ Ammoniumsulfat und 0,5‰ Magnesiumsulfat, mit 1 ccm einer 2%igen wäßrigen Ferrosulfatlösung, mit einer Öse einer gesättigten Chlornatriumlösung und mit einer durch ein Sieb gegossenen Aufschwemmung von Magnesiumcarbonat bis zur milchigen Trübung versetzt und nach Impfung mit der Anreicherungskultur des Nitritbildners in eine Petrischale ausgegossen. Nitritreaktion (Diphenylamin- oder Jodzinkstärkelösung) tritt am 5.—6. Tage auf. Ein mehr augenfälliges Wachstum der sonst sehr klein bleibenden Kolonien läßt sich durch wiederholte Ammongaben erreichen. Zu dem Zweck wird aus der Gallertschicht an zwei gegenüberliegenden Stellen am Rande ein Stück herausgeschnitten. In diese Vertiefungen werden wiederholt einige Tropfen einer 10%igen Ammoniumsulfatlösung hineingegossen, wobei man vor jedem Zusatz die angesammelte Flüssigkeit aus den Vertiefungen mit sterilen Papierstreifen entfernt. Das Magnesiumcarbonat wird in der Umgebung der Ammoniumsulfat oxydierenden Kolonien aufgelöst.

c) Kieselsäureplatten nach BEYERINCK<sup>1</sup>. 5 ccm Wasserglas werden mit 25 ccm Wasser verdünnt und mit 10 ccm Normalsäure versetzt. Das Gemisch wird in eine Petrischale gegossen und gerinnt dort bald. Die Platten werden in fließendem Wasser gewaschen, um die Chloride zu entfernen, dann in sterilisiertem Wasser gewaschen und darauf mit einer Lösung von 0,01 g Dikaliumphosphat, 0,01 g Kaliumnitrat oder 0,01 g Chlorammonium übergossen. Nachdem die Lösung in die Gallerte eingezogen ist, wird die Schale von unten her erhitzt, bis die Gallerte eine trockene glänzende Oberfläche hat. Diese wird noch mit der Bunsenflamme abgesengt. Die Impfung wird oberflächlich ausgeführt. Auf dieser Gallerte wachsen je nach der Zusammensetzung der Nährlösung Nitrit- oder Nitratbakterien und auch die ihre Kohlenstoffnahrung aus der Luft nehmenden Bakterien (*Bac. oligocarophilus* BEY.).

d) Nährgipsplatten nach OMELIANSKI. 100 g Gips, 1 g Magnesiumcarbonat werden mit Wasser bis zur Konsistenz von saurem Rahm angerührt und auf eine Glasplatte ausgegossen. Aus der Gipstafel schneidet man entsprechende Teile für Petrischalen und Reagensgläser heraus. In die Schalen und Reagensgläser bringt man so viel von der oben unter a) beschriebenen anorganischen Nährlösung, daß die Platten zur halben Höhe in der Flüssigkeit stehen und die Streifen für Reagensglaskulturen gut feucht sind. Es wird bei 120° im Autoklaven sterilisiert. Trocknen die Gipsblöcke aus, so wird sterilisierte Nährlösung aseptisch neben die Platte getropft. Die Impfung erfolgt oberflächlich durch die Ausbreitung eines Tropfens einer angereicherten flüssigen Kultur auf der glatten Oberfläche mittels eines Platindrahtes oder rechtwinklig gebogenen Glasstabes. Bei 25—30° bilden Nitritbakterien in 10—14 Tagen bis 0,5 mm große Kolonien.

### 3. Nährböden für Nitratbakterien.

a) Nährlösung zum Anreichern der Nitratbakterien nach WINOGRADSKI:

<sup>1</sup> BEYERINCK: Zentralbl. Bakteriol. II. Abt., 1903, 10, 38.

|                                     |        |                           |       |
|-------------------------------------|--------|---------------------------|-------|
| Wasser . . . . .                    | 1000 g | Natriumchlorid . . . . .  | 0,5 g |
| Natriumnitrit . . . . .             | 1 g    | Ferrosulfat . . . . .     | 0,4 g |
| Gegülhtes Natriumcarbonat . . . . . | 1 g    | Magnesiumsulfat . . . . . | 0,3 g |
| Kaliumphosphat . . . . .            | 0,5 g  |                           |       |

b) Nähragar zur Isolierung der Nitratbakterien aus angereicherten Kulturen nach WINOGRADSKI:

|  |        |                          |         |
|--|--------|--------------------------|---------|
| Leitungswasser . . . . .               | 1000 g | Kaliumphosphat . . . . . | 0,01 g  |
| Natriumnitrit . . . . .                | 2 g    | Agar . . . . .           | 15,00 g |
| Wasserfreies Natriumcarbonat . . . . . | 1 g    |                          |         |

## B. Abfüllen und Aufbewahren der Nährböden.

Die Nährböden werden in ERLÉNMEYER-Kolben, möglichst in Portionen von nicht mehr als 250 g an einem kühlen, dunklen Orte aufbewahrt. Als Verschluss der Kolben dient ein Wattestopfen, der aus glatt aneinanderliegenden Schichten gerollt worden ist und mit einem mit Sublimatlösung angefeuchteten Pergamentpapier überbunden wird. Dieser Verschluss ist allen anderen sonst empfohlenen an Sicherheit und Bequemlichkeit weit überlegen. Müssen die Nährböden voraussichtlich längere Zeit aufbewahrt werden, so ersetzt man die Pergamentkappe durch eine solche aus Gummi. Man kann auch den Wattestopfen etwas tiefer in den Hals des Kolbens hineinschieben und diesen dann mit geschmolzenem Paraffin ausfüllen. Bei der Verwendung erwärmt man den Kolbenhals in der Flamme schwach, so daß das Paraffin am Glase erweicht, zieht nun den Stopfen mittels einer festen Pinzette heraus und ersetzt ihn durch einen solchen aus steriliertem Watte. Ist ein Nährboden infolge längerer Aufbewahrung ausgetrocknet oder konzentrierter geworden, so fügt man die entsprechende Menge steriles Wasser hinzu. Bei Gelatine- und Agarnährböden muß man nach der Verflüssigung die entstehenden Schichten von Wasser und konzentriertem Nährboden sorgfältig mischen.

Für Kulturzwecke müssen die Nährböden in kleinere Gefäße abgefüllt werden. Für Gelatine- und Agarnährböden kommen in erster Linie Reagensgläser, für Nährlösungen daneben auch Kolben verschiedener Art in Betracht. Die sauber gereinigten Gläser werden zunächst mit einem glatt anliegenden Wattestopfen verschlossen und trocken sterilisiert.

Da es beim Abfüllen der Nährböden im allgemeinen auf genau abgemessene Mengen nicht ankommt, verfährt man in folgender Weise: Den flüssigen Nährboden gibt man in einen größeren durch einen Stativring gehaltenen Glastrichter, der unten einen Gummischlauch mit Quetschhahn trägt. Im freien Ende des Schlauches steckt ein nicht zu enges ausreichend langes Glasrohr (Abb. 15), durch das der Nährboden beim Öffnen des Quetschhahnes ausfließt. Beim Abfüllen von Gelatine und Agar ist besonders darauf zu achten, daß der obere Teil des Reagensrohres in den der Wattedropf zu sitzen kommt, völlig trocken bleibt, weil sonst der Wattedropf unter Umständen sehr fest anklebt. Gelatinierende Nährböden müssen beim Abfüllen genügend heiß sein, insbesondere Agar, damit keine Verstopfung des Ausflußrohres eintritt. Die gefüllten Röhren werden sofort mit einem Wattestopfen verschlossen.

In die Reagensgläser füllt man je nach der Weite 7—10 ccm Nährboden. Für die Kultur von anaeroben Bakterien in hoher Schicht werden 15 ccm eingefüllt. Die gefüllten Röhren werden sofort sterilisiert, Gelatine- und andere hitzeempfindliche Nährböden  $\frac{1}{2}$  Stunde im Dampftopf, Agar- und beständigere

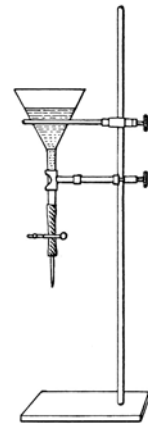


Abb. 15.  
Einfache Abfüll-  
vorrichtung.  
(Nach KLIMMER.)

Nährböden  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Stunde im Autoklaven bei 1 Atmosphäre Überdruck. Nach dem Sterilisieren läßt man die Nährböden möglichst schnell aufrechtstehend oder in einem flachen Blechgestell liegend, erstarren. Im letzteren Falle entstehen Keile von Gelatine und Agar mit einer langen Oberfläche. Man bezeichnet solche Röhrchen als schräge Gelatine- oder Agarröhrchen.

An dem Behälter der fertigen Nährböden sind Tag der Herstellung, Zusammensetzung und Reaktion zu vermerken.

Vor der Verwendung der Nährböden prüft man sie (mit Ausnahme der Gelatine) durch 1—2tägliches Aufbewahren im Brutschrank auf Keimfreiheit.

### **C. Brauchbarkeit der Nährböden für verschiedene Zwecke der Pilzkultur.**

Hinsichtlich der Anwendung der Nährböden für die verschiedenen Aufgaben der mykologischen Forschung mögen folgende Fingerzeige dienen:

Für die Gewinnung von Reinkulturen aus Pilzgemischen werden in allen Fällen am vorteilhaftesten die Gelatine- und Agarnährböden in Form von Plattenkulturen (vgl. unter IV, A, 4, S. 1577) verwendet, wobei nötigenfalls die Kultur mehrere Male mit dem vorgereinigten Material wiederholt wird. Reinzuchtgewinnung mittels Nährlösung ist, abgesehen von den Hefen (siehe diese), jetzt wegen zu großer Unsicherheit aufgegeben.

Für die Untersuchung der Entwicklungsgeschichte eines Pilzes, die unter dem Mikroskop in der feuchten Kammer von der Sporenkeimung an verfolgt werden soll, eignen sich Gelatinenährböden oder entsprechende Nährlösungen. Bei Anwendung letzterer ist es meist nötig, dafür Sorge zu tragen, daß in der betreffenden Deckglaskultur nur eine Spore vorhanden ist. Bei Gelatinenährböden können deren mehrere vorhanden sein, wenn der Ort der einzelnen Sporen genau bestimmt wird.

Für das Studium der Entwicklungsgeschichte von Bakterien eignen sich auch in Reagensgläsern erstarrte Agarnährböden, auf deren Oberfläche eine Aufschwemmung der Sporen verteilt wird. Von Zeit zu Zeit müssen Proben für die mikroskopische Untersuchung entnommen werden.

Größere Pilze, die in den Deckglaskulturen nicht zur vollen Entwicklung kommen, werden, falls eine mikroskopische Kontrolle nötig ist, in Nährflüssigkeitstropfen auf Objektträgern in feuchter Atmosphäre kultiviert. Der erschöpfte Tropfen kann mit sterilisiertem Fließpapier abgesaugt und durch einen neuen ersetzt werden. Zur höchsten Entwicklung kommen allerdings viele höhere Pilze auch dann noch nicht. Um diese zu erreichen, müssen die konzentrierten natürlichen Nährböden (Mist, Brot, Früchte, Rüben u. a.) angewendet werden. Kulturen auf diesen Stoffen dienen auch zur Feststellung mancher chemischen Lebensäußerungen (Bildung von Farbstoffen, Säuren, Alkohol usw.).

Für die Herstellung von Massenkulturen von Bakterien, Hefen und vielen höheren Pilzen, die zur Bereitstellung größerer Mengen für Zwecke der Impfung, zur Erzeugung kennzeichnender Wachstumsformen, Erkennung chemischer Leistungen (Enzymbildung, Farbstoffbildung, Säure-, Alkalibildung u. a.) dienen, eignen sich die Gelatine- und Agarnährböden in verschiedener Form, ferner die verschiedenartigen Nährlösungen, Kartoffeln, Rüben u. a.

## **IV. Reinzüchtung von Bakterien und Eumyceten.**

Für die Erforschung der Eigenschaften eines Pilzes ist die Herstellung einer Reinkultur des betreffenden Organismus Voraussetzung. Unter einer absoluten Reinkultur versteht man die Kultur einer Art unter völligem Ausschluß einer anderen Art. Erst mit solchen Reinkulturen können sichere

Erfahrungen über das physiologische Verhalten einer Art gewonnen werden. Auch für morphologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen dienen als Ausgangspunkt die absoluten Reinkulturen. Nur wenn das Ausgangsmaterial relativ rein ist und aus großen Formen besteht, die in ihnen besonders zusagenden Nährsubstraten gezüchtet werden, kann bei entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen unter Umständen von der Herstellung der absoluten Reinkultur abgesehen werden. Die Reinkultur kann im idealen Falle ihren Ausgang von einer Zelle genommen haben: in diesem Falle spricht man von einer Einzellkultur. Sie kann aber auch von mehreren Individuen abstammen. Die zahlreichen Verfahren, die zur Herstellung von Reinkulturen dienen, lassen sich auf zwei Hauptverfahren zurückführen, auf das Verdünnungs- und das Anreicherungsverfahren. Ersteres ist ein mechanisches, letzteres ein physiologisches Verfahren. Häufig werden beide kombiniert angewendet. Eine besondere Methodik erfordert die Kultur der gegen Luft-sauerstoff empfindlichen (anaeroben) Bakterien (vgl. unter C).

## A. Verdünnungsverfahren.

### 1. HANSENSCHES VERFAHREN MIT FLÜSSIGEN NÄHRBÖDEN.

Bei den Verdünnungsverfahren mit flüssigen Nährböden verfährt man in der Weise, daß man ein Keimgemisch in einer Flüssigkeit so verteilt, daß möglichst alle Zellen vereinzelt sind, und dann die Flüssigkeit soweit verdünnt, daß in einer kleinen Menge, z. B. 1 ccm, höchstens noch ein Keim vorhanden ist. Überträgt man nun mehrere Male je 1 ccm in neue sterilisierte Nährlösung, so wird man in einzelnen dieser Impfungen noch Wachstum eintreten sehen, in anderen nicht. Dieses Verfahren verlangt natürlich eine genaue Kenntnis der in dem Ausgangsgemisch vorhandenen Keimzahl. Es eignet sich daher nur für größere Organismen wie Hefen und größere Pilzsporen. In eine brauchbare Form ist es für Hefen von CHR. HANSEN gebracht worden. HANSEN schwemmte Hefe in sterilisiertem Wasser auf und verteilte sie vollständig durch Schütteln. Darauf bestimmte er durch Zählung unter dem Mikroskop mittels quadrierter Deckgläser die Zahl der Hefenzellen in einem Tropfen bestimmter Größe und verdünnte nun so stark, daß höchstens jedes zweite Tröpfchen eine Zelle enthielt. Darauf wurden mehrere Kolben mit sterilisierter Würze mit je einem Tröpfchen geimpft, kräftig geschüttelt und dann ruhig hingestellt. Die Zellen sanken zu Boden und aus jeder entstand dort ein Flecken. Nur Kolben mit einem Hefenflecken waren voraussichtlich mit einer Zelle geimpft worden. Nach diesem Verfahren hat HANSEN die ersten Reinkulturen verschiedener Saccharomyceten hergestellt. Dieses Verdünnungsverfahren nach HANSEN wird heutzutage in der Praxis kaum noch angewendet, da es umständlich ist und die Sicherheit vermissen läßt. Über das von HANSEN später angegebene Einzellkulturverfahren vgl. S. 1581.

### 2. LINDNERSCHE TRÖPFCHENKULTUR.

Diese ist eine Verbesserung des Verdünnungsverfahrens, die es gestattet, mit absoluter Sicherheit Reinkulturen in Flüssigkeiten herzustellen, die aus einer Zelle entstanden sind. Nach P. LINDNER verdünnt man die keimhaltige Flüssigkeit soweit mit geeigneter Nährflüssigkeit, daß ein Tröpfchen im Durchschnitt nur eine Zelle enthält (Kontrolle bei 300—400facher Vergrößerung). Dann zieht man um den Rand der Höhlung eines über der Bunsenflamme erhitzten (flambierten), noch warmen hohlgeschliffenen Objektträgers mittels eines Pinsels einen mehr hohen als breiten Ring von etwas erweichter Vaseline



und legt ein flambiertes Deckglas, das man an zwei gegenüberliegenden Ecken zwischen den Fingern hält, mit der flambierten Seite nach unten, lose auf den Ring. Hierauf wird mittels einer durch Erwärmen über der Flamme (nicht Glühen!) sterilisierten Zeichenfeder, die mit Draht an einem Glasstab befestigt ist, eine größere Zahl Tröpfchen rasch nacheinander reihenweise auf die flambierte (untere) Seite des Deckelglases innerhalb des Vaselineinges aufgetragen (Abb. 16) und das Gläschen sogleich wieder auf den Vaselineing gelegt und sorgfältig ange-

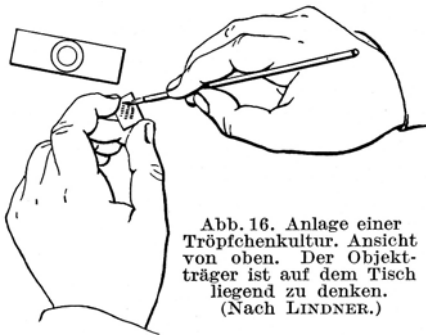


Abb. 16. Anlage einer Tröpfchenkultur. Ansicht von oben. Der Objektträger ist auf dem Tisch liegend zu denken. (Nach LINDNER.)

wobei sie zwischen den Fingern gerieben werden, hierauf mit einem Leinwandlappen abgerieben und vorsichtig flambiert. Statt der Tröpfchen können auch kurze Striche (Federstrichkultur) gezogen werden (Abb. 17). Beim Durchsuchen der Tröpfchen bei 300—400facher Vergrößerung wird man mehrere mit nur einer Zelle finden. Diese markiert man durch zwei mittels der Zeichenfeder unter mikroskopischer Kontrolle neben sie gesetzte Tintenpunkte auf der Oberseite des Deckgläschens. Die Tinte darf nicht zu dünnflüssig sein. Nachdem sich die Zelle etwas vermehrt hat, taucht man mit einer gut abgeflammt Pinzette ein Stückchen

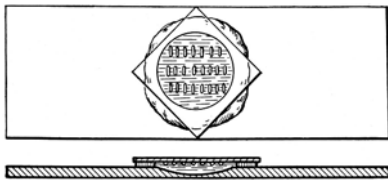


Abb. 17. Tröpfchenkultur. Die Nährlösung ist gleichmäßig in dünnen Strichen aufgetragen. (Nach LINDNER.)

im Trockenschrank bei 150° sterilisiertes Fließpapier in das Tröpfchen und überträgt dann das Papier in ein Röhrchen mit Nährboden. Oder man entnimmt mit einem spitzen Platindraht, ein winziges Stückchen sterilisierte Gelatine, betupft damit das Tröpfchen und überträgt dann die Gelatine in frischen Nährboden. Das LINDNERSche Verfahren eignet sich sehr gut für größere Zellen, weniger für Bakterien, da hier die mikroskopische Kontrolle sehr schwer wird.

### 3. Tuschepunktkultur nach BURRI.

Für die Herstellung von Einzellkulturen von Bakterien hat BURRI<sup>1</sup> ein Verfahren, die „Tuschepunktkultur“, angegeben. Mit Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnte käufliche flüssige Tusche (z. B. Pelikantusche von Günther & Wagner) wird zu 5 oder 10 ccm in Reagensgläsern im Autoklaven sterilisiert, hierauf zentrifugiert oder 8—14 Tage zum Absetzen stehen gelassen. Die Flüssigkeit impft man mit dem Bakterienmaterial und bringt sie empirisch derart auf eine bestimmte Keimzahl, daß ein Tröpfchen von 0,1—0,2 mm Durchmesser durchschnittlich nur noch einen Keim enthält. Die Tröpfchen werden mittels einer flambierten Zeichenfeder auf eine Schicht frisch erstarrter Nährgelatine reihenweise aufgetragen und nach dem in wenigen Sekunden erfolgten Eintrocknen mit einem flambierten Deckglas bedeckt. Man untersucht nun die Tröpfchen mit starken Systemen, wobei die Bakterien als helle Stellen in der Tusche leicht

<sup>1</sup> BURRI: Zentralbl. Bakteriolog. 1908, II. Abt., 20, 95. Eingehend beschrieben in der Schrift: BURRI: Das Tuscheverfahren. Jena 1909.

erkennbar sind. Tröpfchen mit nur einem Keim kann man, wenn die Art auf Gelatine wächst, mit dem Deckglas bedeckt liegen lassen und nach Entwicklung zur Kolonie abimpfen. Verlangt der zu isolierende Organismus eine höhere Temperatur, so entfernt man das Deckglas, an dem der Tuschetropfen hängen bleibt, behutsam von der Gelatine und bringt es auf eine etwas abgetrocknete Agarschicht, auf der dann die weitere Kultur erfolgt. Flüssige Kulturen kann man in der Weise anlegen, daß man auf den betreffenden Tuschefleck ein Tröpfchen Nährflüssigkeit bringt und das Deckglas auf den Hohlsliff eines hohlen Objektträgers kittet.

Ein anderes Verfahren zur Bakterieneinzellkultur hat SCHOUTEN<sup>1</sup> angegeben. Erwähnt sei auch das vervollkommnete Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen mit Hilfe des Mikromanipulators nach PETERFI<sup>2</sup>.

#### 4. Plattenkulturverfahren.

Alle diese Einzellverfahren sind für gewisse Untersuchungen, besonders für solche physiologischer Art, sehr wichtig. Sie geben aber keine schnelle Übersicht über die Zusammensetzung eines Keimgemisches. Man verfährt daher jetzt in den meisten Fällen zur Reinzüchtung sowohl von Bakterien wie von Eumyceten nach einem von SCHRÖTER angebahnten, von ROBERT KOCH in eine brauchbare, handliche Form umgearbeiteten Verfahren. Bei diesem wird ebenfalls eine starke Verdünnung der Keime in Wasser oder entsprechenden Flüssigkeiten vorgenommen, von der Bestimmung ihrer Zahl aber abgesehen und die getrennte Entwicklung der Keime dadurch gewährleistet, daß man die keimhaltige Flüssigkeit in nährstoffhaltige Lösungen von Gelatine oder Agar überträgt, die man in dünnen Schichten auf Glasplatten erstarren läßt. Die aus jeder Zelle durch die Vermehrung entstehenden neuen Individuen sind durch die starren Nährböden am Entstehungsort fixiert und erzeugen deshalb eine allmählich mit bloßem Auge erkennbare Kolonie von oft typischer Gestalt.

Dieses Plattenkulturverfahren gibt also im Gegensatz zum HANSENSchen (vgl. unter A 1) einen Überblick über die Zusammensetzung eines Keimgemisches. Freilich bietet es ebensowenig wie das HANSENSche eine Garantie dafür, daß jede Kolonie aus einer Zelle entstanden ist. Doch ist der Prozentsatz der Mischkolonien nach HANSENS Untersuchungen nicht sehr erheblich, und man kann durch Wiederholung der Reinzüchtung mit dem vorgereinigten Material des ersten Versuches leicht zur absoluten Reinkultur gelangen.

Das Plattenkulturverfahren wird jetzt in der verschiedensten Weise ausgeführt; die wichtigsten Formen desselben sollen im folgenden beschrieben werden.

**a) Kochsche Plattenkultur.** Diese Form des Plattenkulturverfahrens ist die im allgemeinen gebräuchliche, die für die große Mehrzahl der Fälle ausreicht. Das Verfahren wird in folgender Weise ausgeführt:

Das zu untersuchende Pilzgemisch wird mit sterilisiertem Leitungswasser verdünnt (destilliertes Wasser wirkt unter Umständen schädigend auf die Organismen). Darauf verflüssigt man mehrere Röhrcchen mit Nährgelatine (vgl. S. 1569) bei etwa 30°, läßt sie auf 25° abkühlen und impft in das eine mit einer abgeglühten und wieder erkalteten kleinen Platinöse ein Tröpfchen des Keimgemisches. Man dreht zu diesem Zweck den Wattestopfen aus dem Glase heraus, faßt ihn mit den Fingern an dem oberen nicht in das Röhrcchen gehörenden Teil, flammt den Rand des Röhrcchens ab, um etwaige Wattereste zu entfernen

<sup>1</sup> SCHOUTEN: Zeitschr. wiss. Mikroskopie 1905, 22, 10.

<sup>2</sup> PETERFI: Methodik der wissenschaftlichen Biologie 1928, Bd. I.

und impft. Dabei wird das Röhrcchen möglichst wagerecht gehalten, um Luftinfektion zu vermeiden. Ist der Nährboden bereits vor einiger Zeit abgezogen und in dem Röhrcchen aufbewahrt worden, so brennt man den Wattestopfen, ehe man ihn aus dem Röhrcchen herauszieht, ab, um daraufliegende Keime zu töten. Nach der Impfung wird das Röhrcchen sofort mit dem Wattestopfen verschlossen, dann der Platindraht abgeglüht. Hierauf mischt man den Inhalt des geimpften Röhrcchens durch vorsichtiges Drehen um die Längsachse, öfteres

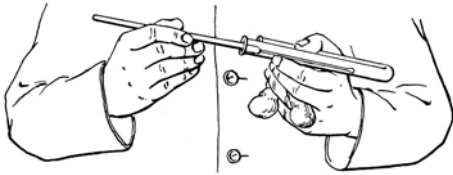


Abb. 18. Anlegen von Verdünnungen für Gelatineplatten.

Neigen und rasches Wiederaufrichten. Durchaus zu vermeiden sind Schütteln und andere hastige Bewegungen, die in der Gelatine Luftblasen hervorrufen. Auch darf die Gelatine beim Mischen nicht in den Wattestopfen laufen.

Hat man, wie dies meist der Fall sein wird, die Verdünnung des Keimgemisches nach Schätzung hergestellt, so muß man damit rechnen, daß die

Keimzahl so groß ist, daß bei späterer Entwicklung die einzelnen Kolonien einander berühren. Man sichert sich deshalb, indem man von dem geimpften Röhrcchen, dem Original, Verdünnungen anlegt, indem man aus dem gut gemischten Original einige größere Platinösen voll Material (etwa 3—5) in ein zweites Röhrcchen (Erste Verdünnung), aus diesem wieder nach gutem Mischen 3—5 Ösen in ein drittes Röhrcchen (Zweite Verdünnung) überträgt. Der Anfänger kann sicherheitshalber auch noch eine dritte Verdünnung anlegen. Bei der Herstellung der Verdünnungen empfiehlt sich folgendes Verfahren:

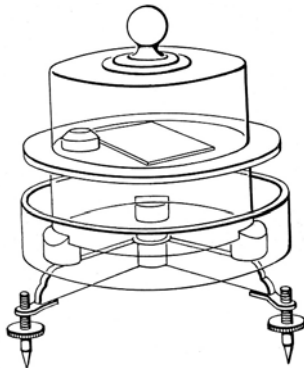


Abb. 19. Plattengießapparat aus Glas für Eiskühlung.

Das Röhrcchen, von dem abgeimpft werden soll, wird zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand, und zwar in die Ecke gelegt, das zu impfende daneben. Die Röhrcchen sind wieder möglichst horizontal zu halten. Der Wattestopfen des zu impfenden Röhrcchens kommt unter den obenerwähnten Vorsichtsmaßregeln zwischen Zeige- und Mittelfinger, der des Abimpflings zwischen Mittel- und Ringfinger der linken Hand (Abb. 18).

Nach beendigter Impfung und Mischung wird die Gelatine nunmehr auf Glasplatten in dünner Schicht ausgegossen und dort erstarren gelassen. Man benutzte früher hierzu allgemein viereckige Glasplatten aus Fensterglas, die auf einem durch Eis oder Wasser gekühlten, genau horizontal eingestellten Glas- oder Metallbehälter (Abb. 19 und 20)

gelegt und gegen Infektion aus der Luft durch Glasglocken geschützt waren. Nach dem Erstarren der Gelatine wurden die Platten auf sterilisierten Glasbänken in großen Glasdoppelschalen (feuchten Kammern) aufbewahrt.

An Stelle der Glasplatten verwendet man jetzt fast nur noch die sog. PETRI-Schalen (Abb. 21). Dies sind niedrige Doppelschalen von etwa 9 cm Durchmesser (für manche Zwecke werden auch größere Dimensionen gewählt), in deren untere Hälfte die Gelatine gegossen wird. Die Gefahr einer Verunreinigung durch Luftkeime ist bei Verwendung von PETRI-Schalen nicht so groß wie bei Glasplatten, wenn man die Schalen nur soweit lüftet, daß man mit der Öffnung des Röhrcchens zwischen sie gelangen kann.

Etwas schwieriger gestaltet sich die Herstellung von Nähragarplatten, da die Agarnährböden erst nach längerem Verweilen im kochenden Wasserbad

flüssig und schon bei 40° wieder fest werden. Man muß, da Temperaturen über 40° für viele Bakterien schon gefährlich werden, sehr schnell arbeiten, damit der Nährboden nicht vor dem Ausgießen erstarrt.

Auf den Platten entwickeln sich nach einigen Tagen mehr oder weniger verschiedenartige Kolonien (Abb. 22). Je nachdem sie auf der Oberfläche oder im Innern der Gelatine liegen, sehen sie auch bei derselben Art verschieden aus. Die Gestalt der innen liegenden Kolonien ist im allgemeinen kugel- oder linsenförmig, während die Oberflächenkolonien meist größer und an Gestalt mannigfaltiger sind. Bei höheren Pilzen kommen meist nur Oberflächenkolonien in Frage.

Die Platten werden zunächst behufs vorläufiger Feststellung der Zahl und Häufigkeit der Arten bei schwacher Vergrößerung betrachtet. Bei Petri-Schalen kann man, um Luftverunreinigung zu vermeiden, in den geschlossenen Schalen die Besichtigung von der Unterseite her vornehmen. Man beginnt diese Untersuchung stets mit dem Original, da man auf dieser stärksten bewachsenen Platte auch in geringer Zahl vorhandene Arten auffinden kann, die vielleicht in den Verdünnungen fehlen, und geht dann zu diesen über. Darauf schreitet man zum Abstechen der Kolonien, wozu eine spärlicher bewachsene Platte benutzt wird. Man sucht eine gut ausgebildete, möglichst weit von anderen entfernt liegende Kolonie auf und untersucht zunächst mit schwacher Vergrößerung auf das sorgfältigste, ob die Kolonie tatsächlich rein ist und nicht etwa eine kleinere fremde einschließt. Dabei muß man beachten, daß Oberflächenkolonien, die sich aus einem dicht unter der Gelatineoberfläche liegenden Keim gebildet haben, in der Mitte meist die kleine kreisrunde Innenkolonie, die sich später beim Durchbruch an die Oberfläche zur Oberflächenkolonie entwickelte, zeigen.

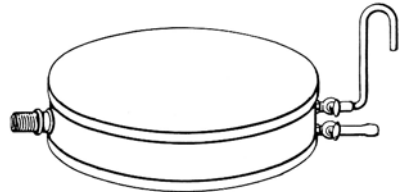


Abb. 20. Plattengießapparat aus Metall für Wasserkühlung.

Ist die Platte sehr spärlich bewachsen, so kann man nunmehr unter Beobachtung mit der Lupe mittels eines abgeglühten Platindrahtes den Rand der Kolonie betupfen und die geringe Keimmenge, die an der Drahtspitze hängen bleibt, in ein Reagensglas mit sterilem Nährboden übertragen. Je nach der Konsistenz der Kolonie wird man zuweilen das Drahtende besser zu einem kleinen Spatel hämmern oder zu einem Haken umgestalten.



Abb. 21. PETRI-Schale.

Ist die Platte dichter bewachsen, so muß das Abstechen unter mikroskopischer Kontrolle erfolgen. Man stellt zu dem Zwecke eine möglichst freiliegende Kolonie mit dem schwächsten Objektiv ein. Darauf führt man den Platindraht, dessen Spitze man zweckmäßig ein wenig nach unten gebogen hat, zwischen Objektiv und Platte, ohne diese zu berühren, indem man gleichzeitig ins Mikroskop sieht, bis die Spitze im Gesichtsfelde erscheint. Nun tupft man wieder an den Kolonienrand und verfährt im übrigen wie oben. Kommt man mit dem Draht unbeabsichtigt an die Platte, so muß er sofort wieder abgeglüht werden. Die Führung des Drahtes kann man erheblich sicherer gestalten, wenn man den kleinen Finger der rechten Hand auf den Objektträger stützt.

Die abgeimpften Keime streicht man mit der Nadel gewöhnlich auf einen schräg erstarrten Nährboden aus (Strichkultur); seltener sticht man die Nadel in ihrer ganzen Länge in die Mitte des im Röhrchen gerade erstarrten Nährbodens (Stichkultur) oder man überträgt in flüssige Nährböden (vgl.

S. 1567). Die so erzeugten Reinkulturen müssen dann mikroskopisch und wenn nötig durch nochmalige Plattenkultur auf ihre Reinheit geprüft werden.

Unangenehme Störungen rufen auf den Platten zuweilen Arten hervor, die die Gelatine schnell peptonisieren, so daß die Platte zerläuft, ehe man langsamer wachsende Arten abstechen kann. Auch Schimmelpilze überwuchern zuweilen die Platten sehr schnell. Der peptonisierenden Kolonien kann man sich nach HILTNER<sup>1</sup> dadurch erwehren, daß man sie zeitig mit einem Höllensteinstift betupft. Für Schimmelpilze empfiehlt KLÖCKER Bedeckung der Kolonie mit einem Stückchen Filtrierpapier, das in 10%iger

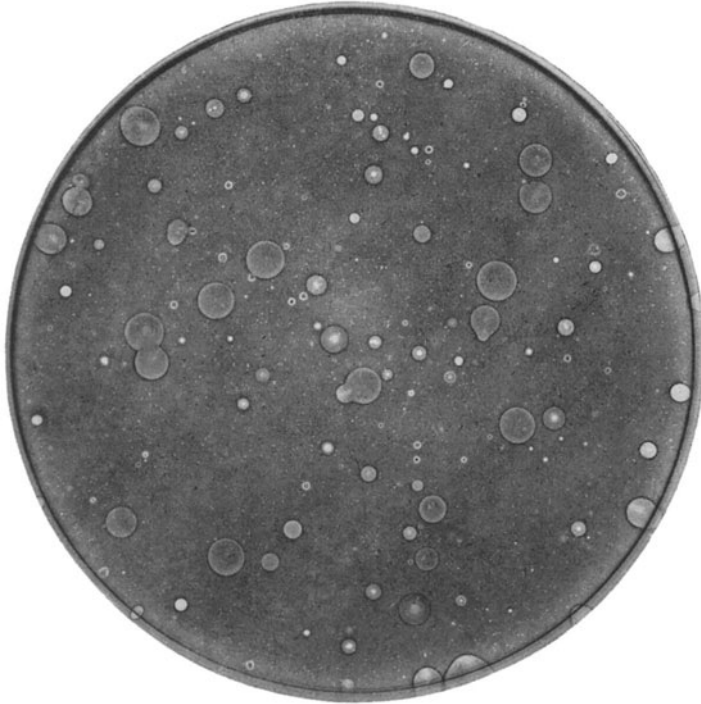


Abb. 22. Dicht besäte Kulturplatte nach OHLMÜLLER.

alkoholischer Lösung von Salicylsäure gelegen hatte. Auch in diesem Falle ist die Bekämpfung vorzunehmen, solange die Kolonien noch klein sind.

**b) Oberflächenkultur.** Da das Abstechen der Innenkolonien auf den üblichen Platten manchmal einige Schwierigkeiten bereitet, auch die Oberflächenkolonien meist kennzeichnender sind, so ist von verschiedener Seite vorgeschlagen worden, nur die Oberfläche erstarrter Platten zu impfen. Die Keime werden in sterilisiertem Wasser aufgeschwemmt und nun mittels eines Pinsels aus feinem Platindraht, oder eines gewöhnlichen Tuschpinsels, der durch Eintauchen in kochendes Wasser sterilisiert wurde, oder eines am Ende rechtwinkelig gebogenen sterilisierten Glasstabes (DRIGALSKI-Spatels) oder eines Zerstäubers auf die Oberfläche verteilt. Bestreicht man mit einer Füllung des Pinsels oder des Glasstabes mehrere Platten nacheinander, so erhält man auch immer stärkere Verdünnungen. Man kann auch (nach LINDNER'S Vorschlag) so verfahren, daß man auf einer Platte Streifen mit immer stärkeren

<sup>1</sup> HILTNER: Arb. Reichsgesundh.-Amt, Biol. Abt. 1903, 3, 445.

Verdünnungen der Keimemulsion anlegt, wodurch man an Material und Raum spart (Abb. 23).

c) **Rollkultur.** Alle bisher beschriebenen Verfahren leiden an der Möglichkeit einer spontanen Infektion durch Luftkeime. Für gewöhnlich spielt diese Infektion keine große Rolle. Kommt es aber darauf an, wenige Keime in einem Medium oder gar die Keimfreiheit desselben nachzuweisen, so verwendet man besser das von ESMARCH eingeführte Verfahren der Rollkulturen. Dieses Verfahren weicht nur insofern von dem gewöhnlichen Plattenkulturverfahren ab, als die Gelatine nach der Impfung nicht zu einer Platte ausgegossen, sondern an der Wandung des Röhrchens zum Erstarren gebracht wird, so daß also eine Rollplatte entsteht. Man verwendet in diesem Falle

vorteilhaft etwas längere und weitere Reagensgläser und etwas weniger Gelatine. Nach der Impfung kühlt man die Gelatine fast bis auf den Erstarrungspunkt ab und dreht nun das Röhrchen in horizontaler Haltung um seine Längsachse unter dem Wasserleitungsstrahl, bis die Gelatine in dünner Schicht auf der Innenwand erstarrt ist. Dabei darf weder Gelatine noch Wasser in den Wattestopfen laufen. Steht kein fließendes Wasser zur Verfügung, so muß man wiederholt in Wasser abkühlen und in der Luft ausrollen. Die Nachteile dieses Verfahrens sind folgende: Es ist nicht so leicht, aus einer Rollkultur eine Kolonie abzustechen. Zur bequemeren

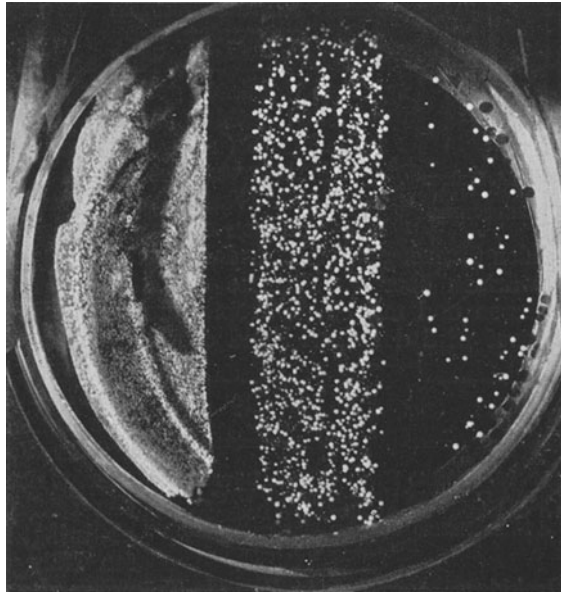


Abb. 23. Pinselstrichkultur von einer Preßhefe. Drei verschiedene Verdünnungen auf derselben Gelatineplatte nach LINDNER. (Natürl. Größe.)

Handhabung der Rollröhrchen unter dem Mikroskop und der Lupe sind daher besondere Apparate eingerichtet worden. Ferner wirken peptonisierende Kolonien störender als auf Platten, da die verflüssigte Gelatine bald das ganze Röhrchen verdirbt. Statt der Reagensgläser kann man nach LINDNER'S Vorschlag auch größere Standzylinder benutzen. Auch sonst ist natürlich jedes Gefäß, z. B. Medizinflaschen, Rundkolben, ERLLENMEYER-Kolben, brauchbar. Im Handel sind von PETRUSCHKY zuerst angegebene flache Flaschen zu haben, die sowohl die Anlage ebener Platten, als auch von Rollplatten gestatten und die Luftinfektion ausschließen (Abb. 24).

d) **HANSENSCHES Einzellverfahren.** Alle bisher beschriebenen Abarten des KOCHSchen Verfahrens bieten keine Sicherheit dafür, daß eine Kolonie aus einer Zelle entstanden ist. Für sehr kleine Organismen, wie Bakterien, ist in dieser Beziehung auch nur in selteneren Fällen Sicherheit zu schaffen. Dagegen hat HANSEN für größere Zellen (Hefen, Pilzsporen) mit Erfolg ein jetzt vielfach angewendetes Verfahren ausgearbeitet, bei dem die Entwicklung der Kolonien aus einer Zelle in einer entsprechend dünnen Gelatineplatte auf

einem Deckglas in einer kleinen feuchten Kammer mikroskopisch verfolgt werden kann. Solche feuchte Kammern sind in verschiedenen Formen im Handel. Die einfachsten dieser Einrichtungen sind die schon öfter genannten hohlen Objektträger. Häufiger benutzt man die BÖTTCHERSche feuchte Kammer (Abb. 25). Diese besteht aus einem großen Objektträger mit aufgekittetem Glasring. Auf dem Ring wird ein Deckglas mit Vaseline befestigt. Man kann auch das Deckglas an den Ring kitten und diesen mit dem Objektträger durch Vaseline verbinden. Die Ringe der Kammern werden mit 18—30 mm Durchmesser hergestellt.

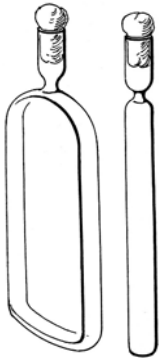


Abb. 24. Kulturflasche nach PETRUSCHKY.

Andere feuchte Kammern, die bei entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen verwendet werden, sollen dort beschrieben werden.

Die Deckgläser sind entweder glatt oder durch Ätzung in kleine Quadrate geteilt, deren jedes eine Nummer (nach JÖRGENSEN) enthält (Abb. 26) oder deren erste obere und erste linke Reihe (nach WILL) numeriert sind (Abb. 25).

HANSEN verfährt nun in folgender Weise: Das Keimgemisch wird mit Wasser soweit verdünnt, daß ein Tröpfchen etwa 20—30 Zellen enthält, wovon man sich im Anfang durch Auszählen überzeugen kann. Sodann werden einige BÖTTCHERSche Kammern durch Erwärmen über der Flamme sterilisiert, unter einer sterilen Glocke erkalten gelassen und mit einem Tröpfchen sterilen Wassers auf dem Boden versehen. Darauf wird der obere Rand des Ringes mit verflüssigter Vaseline bestrichen.

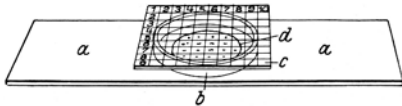


Abb. 25. Feuchte Kammer nach BÖTTCHER mit geteiltem Deckglas nach WILL. a Objektträger, b Glasring, c Deckglas, d Nährgelatine auf der Unterseite des Deckglases.

Nun werden die Deckgläser vorsichtig über der Flamme sterilisiert und ebenfalls unter eine sterile Glocke und nach dem Erkalten auf den Vaselinering gelegt. Hierauf verflüssigt man ein Gelatineröhrchen, nimmt das Deckgläschen vorsichtig vom Ringe ab, bringt mit einem Glasstab einen Tropfen Nährgelatine auf die Unterseite des

Deckglases, verrührt in ihm ein Tröpfchen der Keimaufschwemmung, streicht das Gemisch zu einer dünnen Platte innerhalb des Vaselineringes aus und drückt das Deckglas wieder fest auf den Vaselinering. Nach dem Erstarren der Gelatine müssen gut isolierte Zellen aufgesucht und markiert werden. Man durchsucht die Gelatineschicht sorgfältig in allen Tiefen mit 250 bis 300facher Vergrößerung und markiert einzelne, gut isolierte Zellen. Für glatte Deckgläser kommt die Markierung mittels eines Objektmarkierers von KLÖNNE und MÜLLER oder einer Zeichenfeder in Betracht. Der Objektmarkierer wird an Stelle des Objektivs, in dessen Zentrum die Zelle genau eingestellt war, an das Mikroskop geschraubt und dann vorsichtig mit seiner Spitze gegen das Deckglas gedrückt. Nach dem Zurückschrauben

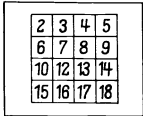


Abb. 26. Geteiltes Deckglas nach JÖRGENSEN.

soll die Zelle innerhalb des gefärbten Kreises liegen. Das Arbeiten mit dem Objektmarkierer ist nicht leicht und die Erfolge entsprechen nicht immer der aufgewendeten Mühe. Einfacher ist die Markierung mit der Zeichenfeder. Man benutzt eine etwas dickflüssige Tinte und macht mit der Zeichenfeder unter mikroskopischer Kontrolle neben die Zelle einen Punkt auf das Deckglas. Man kann natürlich, wenn man einen beweglichen Objektisch mit Skalen hat, auch diese zur Markierung einer Zelle benutzen. Einfacher ist die Verwendung eingeteilter Deckgläser.

Auf Deckgläsern nach WILL notiert man die Zahlen der betreffenden Ordinate- und Abszissenreihe und markiert im übrigen die Lage der einzelnen

Zelle in dem betreffenden Quadrat in einer entsprechenden Zeichnung, gegebenenfalls unter Benutzung zufälliger Einschlüsse. Noch genauer kann die Lage der Zellen in den Quadraten mittels eines Okularnetzmikrometers (vgl. S. 487) festgelegt werden. Auf Deckgläsern nach JÖRGENSEN ist das Quadrat an der eingezätzten Zahl zu erkennen; die Markierung der Zellen in den einzelnen Quadraten erfolgt in der eben beschriebenen Weise.

Nach der Markierung werden die feuchten Kammern bei 20—30° stehen gelassen. Um das Absetzen von Wassertröpfchen auf dem Deckglas und der Gelatine zu verhüten, empfiehlt es sich, die Kammern in eine feuchte Glocke zu setzen, die etwas wärmer ist als die Außentemperatur. Man kontrolliert nach 24 Stunden nochmals die Lage der Zellen. Nach 3—5 Tagen sticht man die vorher durch einen Tuschepunkt auf dem Deckglase bezeichneten Kolonien mit einem kurzen, von einer Pinzette gehaltenen Platindrähtchen oder einer Glascapillare ab und überträgt sie in Kölbchen mit Würze. Man legt dabei das von dem Ringe abgehobene Deckglas auf eine weiße Unterlage und bringt es nach jedesmaligem Abimpfen wieder auf den Ring oder unter eine mit feuchtem Fließpapier ausgekleidete Glocke.

Kombinationen dieser HANSENSchen Einzellkultur und der LINDNERSchen Tröpfchenkultur sind von SCHÖNFELD sowie von WICHMANN und ZIKES („Tröpfchenplattenverfahren“) vorgeschlagen worden. Das Verfahren von SCHÖNFELD unterscheidet sich von dem LINDNERS nur durch die Benutzung von verflüssigter Gelatine als Verdünnungsmittel. WICHMANN und ZIKES verteilen verflüssigte Gelatine auf ein quadriertes Deckglas und tupfen nach dem Erstarren derselben auf jedes Quadrat ein Tröpfchen der keimhaltigen Flüssigkeit mit einem Capillarröhrchen auf. Hierdurch wird einerseits der Vorteil der LINDNERSchen Tröpfchenkultur, daß die Zellen leicht in den Tröpfchen wahrgenommen werden können und andererseits der der HANSENSchen Methode, daß die Kolonien gut heranwachsen und von der Gelatine leicht abgehoben werden können, erreicht.

## B. Anreicherungsverfahren.

Die für Reinzuchtzwecke benutzten Anreicherungsverfahren können physikalische oder biologische sein. Zu ersteren gehört z. B. die Ausfällung der in Flüssigkeiten enthaltenen Bakterien durch künstlich erzeugte Niederschläge, um dann die Fällungen auf Elektivnährböden auszustreichen, ein Verfahren, das z. B. bei der Wasseruntersuchung zuweilen Anwendung findet. Die letzteren beruhen auf der Begünstigung gewisser physiologischer Eigenschaften bestimmter Organismenarten, die dadurch das Übergewicht über andere Arten erhalten. Bringt man von solchen „angereicherten“ Kulturen kleine Mengen wiederholt unter dieselben günstigen Bedingungen, so kann man auf diese Weise wohl zu einer Reinkultur eines Organismus gelangen. Immerhin ist die Anwendbarkeit dieses Verfahrens beschränkt. Es verlangt zunächst, daß man die Eigenschaften des betreffenden Organismus genau kennt und gibt natürlich auch keinen Überblick über die Zusammensetzung eines Keimgemisches. Besonders erschwerend aber fällt ins Gewicht, daß verschiedenartige Organismen mit ähnlichen physiologischen Eigenschaften sehr wohl in der Konkurrenz nebeneinander bestehen können. Man ist daher von diesem in früheren Zeiten vielfach angewendeten Verfahren (PASTEURS Verfahren, „fraktionierte Kultur“ nach KLEBS), soweit es zur Erzielung absoluter Reinkulturen in Betracht kommt, abgegangen. Dagegen spielt das Anreicherungsverfahren jetzt noch eine große Rolle als vorbereitendes Verfahren. Wo es darauf ankommt, bestimmte, nur in geringer Zahl vorhandene oder von anderen Arten durch das Plattenkulturverfahren schwer zu trennende Organismen rein zu züchten, leistet das



Anreicherungsverfahren (auch „elektive Kultur“ oder „Vorkultur“ genannt) häufig wertvolle Dienste. Aus den angereicherten Kulturen können dann die gesuchten Arten mittels des Plattenkulturverfahrens leicht rein gezüchtet werden. Die Begünstigung einzelner Arten wird durch Herstellung geeigneter Ernährungs- und Lebensbedingungen erzielt. Besonders Organismen mit ausgesprochenem Gärungsvermögen können durch Einimpfung in einseitig zusammengesetzte Nährlösungen leicht angereichert werden. So wird man, um einige Beispiele anzuführen, eiweißzersetzende Arten in zuckerfreien Nährlösungen, die nur Eiweißstoffe enthalten, anreichern, für denitrifizierende Arten nur Salpeter, für Harnstoff vergärende Bakterien nur Harnstoff als Stickstoff bieten, für Milchsäurebakterien Milch oder andere zuckerreiche Lösungen wählen usw. Von großem Einfluß ist ferner die Temperatur, der Zutritt oder Abschluß des Luftsauerstoffes, die Reaktion der Nährlösung. Sollen sporenbildende Arten angereichert werden, so wird die Konkurrenz nicht sporulierender Arten durch Erhitzen des Impfmateri- als auf Temperaturen von 70—80° ausgeschaltet.

Unter Umständen wird man gut tun, die Anreicherung einige Male zu wiederholen, indem man aus der ersten Kultur, sobald sie in voller Entwicklung begriffen ist, ein wenig in frische Nährlösung überträgt und dies, wenn nötig, nochmals wiederholt.

Das Anreicherungsverfahren hat bei der Reinzüchtung vieler Anaerobier, sowie einiger sehr schwer rein zu erhaltenden Bakterienarten, wie z. B. der Salpeterbakterien, vorzügliche Dienste geleistet.

### C. Verfahren zur Reinzucht an der Luft nicht wachsender (anaerober) Arten.

Das Sauerstoffbedürfnis der Pilze ist bei den einzelnen Arten und selbst innerhalb des Entwicklungskreises einer Art für Sporenceimung, Wachstum und Sporenbildung verschieden. Es sei hier auf die Untersuchungen von A. MEYER und seinen Schülern<sup>1</sup> verwiesen, durch die bei einer Anzahl von Bakterien die Kardinalpunkte für Sporenceimung, Wachstum und Sporenbildung ermittelt worden sind.

Diese Untersuchungen zeigen unter anderem, daß es Bakterien gibt, die ihren gesamten Lebensgang unter völligem Ausschluß von Sauerstoff bewerkstelligen können, wie auch KÜRSTEINER<sup>2</sup> durch andere sehr geschickte Versuche bewiesen hat. Dem verschiedenen Verhalten der Arten gegenüber dem Luftsauerstoff hat man in der Praxis durch eine entsprechende Gruppierung der Bakterien Rechnung zu tragen versucht. Die verbreitetste von ihnen ist die von LIBORIUS, die obligate Aerobier, obligate Anaerobier und fakultative Anaerobier unterscheidet, während ARTH. MEYER eine Einteilung in aerophile (in Luft gedeihende) und aerophobe (niemals in Luft gedeihende) Arten vorschlägt. Wir halten uns im folgenden aus Zweckmäßigkeitsgründen an die Bezeichnungen von LIBORIUS und bezeichnen als obligate Anaerobier solche, die (unter gewissen Einschränkungen) nicht an der Luft wachsen. Für die Praxis der Reinzüchtung ist das bemerkenswerteste Ergebnis dieser Untersuchungen, daß auch die zur Zeit bekannten, gegen Sauerstoff empfindlichsten Pilze nicht absolut von Sauerstoff befreiter Kulturräume bedürfen und daß es andererseits unter Einhaltung gewisser Maßregeln gelingt, absolut sauerstofffreie Züchtungsverhältnisse herzustellen.

<sup>1</sup> A. MEYER: Zentralbl. Bakteriol., I. Abt. Orig. 1906, 42, 97; II. Abt., 1908, 22, 44; I. Abt., 1909, 49, 305.

<sup>2</sup> KÜRSTEINER: Zentralbl. Bakteriol. II. Abt., 1907, 17, 804; 19, 388.

Die Verfahren zur Reinzüchtung der obligaten Anaerobier sind sehr zahlreich und werden immer noch vermehrt, ein Zeichen, daß sie allesamt nicht voll befriedigen. Sie lassen sich auf vier Typen zurückführen, nämlich:

- a) Beschränkung des Luftzutritts;
- b) Absorption des Sauerstoffs durch chemische Stoffe, oft in Kombination mit sauerstoffverzehrenden Bakterien;
- c) Luftverdünnung;
- d) Luftverdrängung durch indifferente Gase.

Manche Verfahren stellen auch eine Kombination dieser Typen, besonders von 2. und 3. oder 3. und 4. dar. Hier sollen nur die gebräuchlichsten Verfahren besprochen werden.

#### a) Beschränkung des Luftzutritts.

Eines der ältesten brauchbaren Verfahren für feste Nährböden ist das von LIBORIUS angegebene, der Kultur in hoher Schicht. Ein Röhrchen mit gut ausgekochter Gelatine oder Agar wird in der üblichen Weise geimpft, gemischt und dann werden die üblichen Verdünnungen hergestellt. Darauf läßt man den Nährboden in den Röhrchen schnell erstarren, gießt eine Schicht flüssigen Nährboden darauf und läßt diesen ebenfalls schnell erstarren. Man kann auch Röhrchen verwenden, die mit der doppelten der sonst üblichen Menge Nährboden gefüllt sind und diese nach der Impfung schnell erstarren lassen, ohne eine Übersichtung vorzunehmen. Stellt man eine genügende Anzahl von Verdünnungen her, so erhält man Röhrchen mit nur wenigen Kolonien, von denen bequem abgeimpft werden kann. Zu diesem Zweck zertrümmert man das Glas vorsichtig am unteren Ende, läßt den Nährstoffzylinder auf eine sterilisierte Glasplatte mit dunkler Unterlage gleiten und zerschneidet ihn mit einem sterilisierten Messer in 1—2 mm dicke Scheibchen, aus denen man bequem die isolierten Kolonien abstechen kann. Die Übertragung erfolgt in Form von Stichkulturen in Röhrchen mit hoher Gelatine- oder Agarschicht.

Das Verfahren der Kultur in hoher Schicht ist von BURRI<sup>1</sup> weiter entwickelt worden. Man benutzt hierzu starkwandige Glasröhrchen (Abb. 27) von 10—12 mm innerer Weite und 18—20 cm Länge, die, beiderseits mit Wattestopfen verschlossen, 2 Stunden bei 160—180° im Lufttrockenschrank sterilisiert werden. Zu diesen Röhren gehören gut passende Kautschukstopfen, die in Wasser bei 125° sterilisiert werden. Man verfährt in folgender Weise: Drei Röhrchen mit 2%igem Glucoseagar werden verflüssigt, ausgekocht und dann in der üblichen Weise als Original und zwei Verdünnungen geimpft. Dann wird der Wattestopfen an dem einen Ende dreier Röhrchen durch einen sterilisierten Kautschukstopfen ersetzt und der geimpfte Nährboden in sie entleert. Den Agar läßt man durch Einstellen der Röhren in kaltes Wasser schnell erstarren und überschichtet ihn dann mit einer etwa 3 cm dicken Agarschicht, die man ebenfalls rasch erstarren läßt. Dann werden die Röhrchen bei gewöhnlicher Temperatur oder im Thermostaten bei 32° gehalten. Nach genügender Entwicklung der Kolonien entfernt man den Gummistopfen, läßt den Agarzylinder auf eine Lage sauberes Fließpapier gleiten oder schiebt ihn mit einem Glasstab

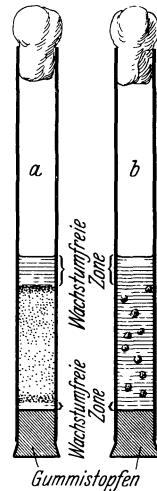


Abb. 27. Anaerobenkultur nach BURRI. *a* dicht, *b* dünn bewachsenes Röhrchen.

<sup>1</sup> BURRI: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1902, 8, 533.

vorsichtig heraus, trocknet ihn durch langsames Hin- und Herrollen, zerschneidet ihn mittels eines sterilisierten Skalpell in Scheiben von 1—2 mm Dicke und überträgt diese zwecks Durchmusterung sofort in eine auf schwarzer Unterlage stehende sterile PETRI-Schale. Darauf spaltet man die Scheibchen mit isoliert und wenigstens 2 mm vom Rand entfernt liegenden Kolonien durch einen Schnitt in der Richtung der abzuimpfenden Kolonie und führt durch Auseinanderreißen der Teilstücke die Schnittlinie fort über die Kolonie hinaus. Von der freigelegten Fläche der Kolonie aus impft man ab, indem man Stichtkulturen in hoher Schicht oder Strichkulturen, die unter Abschluß von Sauerstoff gehalten werden müssen (vgl. die folgenden Verfahren), anlegt. Bei Stichtkulturen wird der bis zum Boden des Röhrchens reichende Stich mit einer Agarschicht von mindestens 3 cm Höhe übergossen.

Bei der Reinzüchtung obligater Anaerobier mittels dieses Verfahrens wird man gut tun, wenn irgend möglich alle fakultativ anaeroben und aeroben Keime, soweit sie keine Sporen bilden, durch 10 Minuten lange Erwärmung des Impfmateri als auf 70—75° abzutöten, vorausgesetzt, daß die obligaten Anaerobier bereits Sporen gebildet haben. Wo die obligaten Anaerobier in der Minderzahl vorhanden sind, wird man sie meist erst durch eine Anreicherungskultur vermehren müssen, ehe man zur Kultur im hohen Röhrchen schreitet. Auch bei den weiter zu besprechenden Verfahren werden diese vorbereitenden Maßnahmen oft gute Dienste leisten.

Plattenkulturverfahren, die auf dem Abschluß der Luft beruhen, sind von verschiedenen Autoren in Anlehnung an einen früheren Vorschlag von ROBERT KOCH empfohlen worden. Sie verwenden PETRI-Schalenplatten von gut ausgekochtem Agar, evtl. mit Zusätzen von Glucose, Schwefelnatrium, Ferroammonsulfat und bedecken diese mit Glas- oder Glimmerplättchen. Dadurch entstehen an den Berührungsflächen von Nährboden und Glas bzw. Glimmer Regionen mit den für das Wachstum der Anaerobier erforderlichen geringen Sauerstoffkonzentrationen. Für solche Plattenkulturen sind sog. DRIGALSKI-Schalen, d. h. PETRI-Schalen von sehr großem Durchmesser, besonders geeignet.

#### b) Absorption des Sauerstoffs durch Chemikalien, Organteile oder Bakterien.

Die Züchtung anaerober Bakterien durch Absorption des Sauerstoffes erfolgt entweder in der Weise, daß man reduzierende Stoffe zum Nährboden gibt oder die Kulturen in eine durch Pyrogallol und Kalilauge von Sauerstoff befreite Atmosphäre bringt.

Als Zusätze zum Nährboden eignen sich unter anderen Glucose, Ameisensäuresaures oder indig-schwefelsaures Natrium. Die Nährböden verwendet man auch in diesem Falle in hoher Schicht.

Brauchbar ist auch das von TAROZZI<sup>1</sup> angegebene Verfahren, Nährflüssigkeiten in üblicher niedriger Schicht aseptisch entnommene Stücke von Tier- und Pflanzenorganen (insbesondere Leber) oder Holzkohle u. a. zuzusetzen. In solchen Flüssigkeiten wachsen selbst obligate Anaerobier unter aeroben Verhältnissen. Wirksam ist hierbei die reduzierende Kraft dieser Stoffe. Auf dem gleichen Prinzip beruht die Wirkung der von PFUHL<sup>2</sup> angegebenen Leberbouillon — gebraucht wird neuerdings gewöhnlich Leberbouillon mit Leberstückchen (Leberleberbouillon nach KITT-TAROZZI) — des Hirnbreies nach von HIBLER<sup>3</sup> und der jetzt allgemein Anwendung findenden Nährböden mit Blutzusatz, wie z. B. des Traubenzuckerblutagars nach ZEISSLER<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> TAROZZI: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt., 1905, 38, 619.

<sup>2</sup> PFUHL: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt., 1907, 44, 378.

<sup>3</sup> HIBLER: Untersuchungen über die pathogenen Anaerobier. Jena 1908.

<sup>4</sup> ZEISSLER: Deutsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 34.

Das Verfahren der Anaerobenzüchtung nach FORTNER<sup>1</sup> beruht auf dem starken Sauerstoffverbrauch eines zugleich kultivierten aeroben Bakteriums. Man verfährt in der Weise, daß man die eine Hälfte einer Agarplatte dick mit einer frischen *Prodigiosus*kultur beimpft und auf die andere Hälfte den betreffenden Anaerobier austreicht. Die beimpfte Schale wird mit Plastilin gegen die Außenwelt luftdicht abgeschlossen. Vervollkommenet wurde das Verfahren durch KLEINSORGEN und JUSATZ<sup>2</sup>, indem sie die Plastilindichtung durch Anwendung eines Gummi-Cellulose-Ringes mit Druckklammerverschluß ersetzten.

Die Herstellung einer sauerstofffreien Atmosphäre durch alkalische Pyrogallollösung ist zuerst von BUCHNER (Abb. 28) für die Züchtung von Anaeroben in Röhren verwendet worden. Das geimpfte Röhren kommt in ein weiteres Rohr, in dem es auf einem Metallbügel ruht. Unter diesem befindet sich eine geringe Menge konzentrierter Pyrogallollösung *b*. In diese wird unmittelbar vor dem Einbringen der Kultur ein Stück Ätzkali geworfen. Darauf wird das weite Rohr mit einem Gummistopfen geschlossen; der Verschluß muß sehr sorgfältig ausgeführt werden, da sonst bald Luft in die Röhren nachdringt. Das BUCHNERSche Verfahren ist von OMELIANSKI wesentlich verbessert worden. Dessen Apparat (Abb. 29) besteht aus einem starken Zylinder, der an seinem unteren Ende erweitert ist und am oberen Ende einen kragenartigen Ansatz trägt. Der Zylinder kann durch einen aufgeschliffenen Helm verschlossen werden. In die untere Erweiterung des Zylinders wird ein Gemisch von je 10 ccm 12,5%iger Kalilauge und 5%iger Pyrogallollösung gefüllt, das Kulturröhren hineingestellt, der Helm auf den Zylinder gesetzt und die noch durch Quecksilber verschlossen. Auf diese Weise wird bei negativem Druck das Eindringen von Luft verhindert, bei Überdruck lüftet sich der Helm etwas.

Ein sehr einfaches, nach KÜRSTEINER<sup>3</sup> außerordentlich brauchbares Verfahren ist das von WRIGHT<sup>4</sup> zunächst für flüssige Kulturen (Abb. 30) angegebene, das KÜRSTEINER und BURRI wesentlich verbessert und auch für feste Röhren und Plattenkulturen ausgearbeitet haben.

Man impft ein etwa 10 ccm Nährflüssigkeit enthaltendes Röhren, brennt den Wattebausch ab, schiebt ihn tief in das Röhren hinein, setzt einen zweiten entfetteten Wattebausch darauf, in den 1 ccm 20%ige Pyrogallollösung und 1 ccm 20%ige Kalilauge gegossen werden, und verschließt das Röhren mit einem gut passenden Kautschukstopfen. Natürlich eignet sich dieses Verfahren auch zur Anlage von Strich- und Stichkulturen, Rollröhren obligater Anaerobier, ferner für Anreicherungskulturen.

Das WRIGHTSche Verfahren ist von KÜRSTEINER auch für ein anaerobes Plattenkulturverfahren dienstbar gemacht worden. Er verwendet als Kultur-

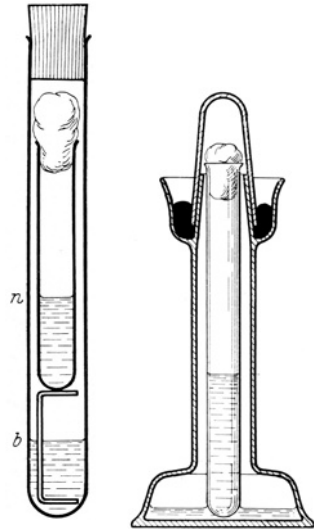


Abb. 28.

Abb. 29.

Abb. 28. BUCHNERS Anaerobenröhre. Bei *b* die Pyrogallollösung, darin das Drahtbänkchen, auf diesem das Reagenzglas mit dem beimpften Nährboden (*n*). (Nach BUCHNER.)

Abb. 29. Anaerobenapparat nach OMELIANSKI.

<sup>1</sup> FORTNER: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt., Orig. 1929, 110, 233.

<sup>2</sup> KLEINSORGEN u. JUSATZ: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt. Orig. 1932, 126, 157.

<sup>3</sup> KÜRSTEINER: Zentralbl. Bakteriolog. II. Abt., 1907, 19, 23.

<sup>4</sup> WRIGHT: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt., 1900, 27, 174.

gefäß einen Glastrog von 80 mm Länge, 30 mm Breite und 7 mm Tiefe. Der Nährboden in ihm wird am besten oberflächlich geimpft. Der Glastrog kommt in ein Reagensglas von 20—25 cm Länge und genügender Weite, so daß etwa ausgepreßtes Wasser nach unten läuft (Abb. 31).

Zur Anlage von Plattenkulturen mit Hilfe der Pyrogallolmethode sind noch eine ganze Reihe von besonderen Schalen konstruiert worden. Jedoch ist es schwierig, auf diese Weise den Sauerstoff soweit und schnell genug zu entfernen, daß die Entwicklung aerober Keime vermieden wird.

Bei den Versuchen, die v. RIJMSDIJK<sup>1</sup> über die Pyrogallolmethode angestellt hat, wurde übrigens als günstigstes Mengenverhältnis 10 ccm Kalilauge (20% ig) auf 3 ccm Pyrogallollösung (44% ig) gefunden. Diese Mischung absorbiert den Sauerstoff aus 400 ccm Luft in 30—40 Minuten.

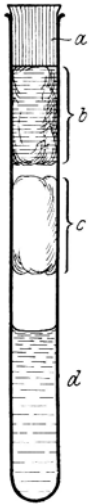


Abb. 30.

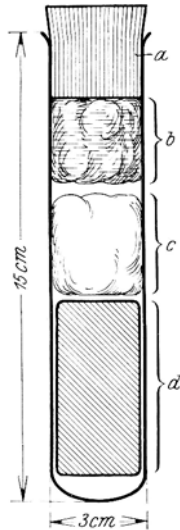


Abb. 31.



Abb. 32.

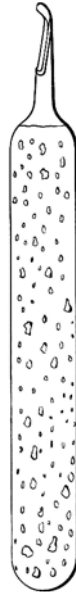


Abb. 33.

Abb. 30. Röhren für Anaerobenzüchtung nach WRIGHT. *a* Gummistopfen, *b* mit Alkali-Pyrogallol getränkter Stopfen aus hygroskopischer Watte, *c* steriler trockener Stopfen aus nicht hygroskopischer Watte, *d* geimpfte Nährflüssigkeit.

Abb. 31. Röhren für anaerobe Plattenkultur nach KÜRSTEINER-WRIGHT. *a* Gummistopfen, *b* mit Alkali-Pyrogallol getränkter hygroskopischer Wattestopfen, *c* sterilertrockener, nicht hygroskopischer Wattestopfen, *d* anaerobe Platte.

Abb. 32. GRUBERS Röhre zur Züchtung von Anaerobiern; gebrauchsfertig.

Abb. 33. GRUBERS Anaeroberröhre. Der Inhalt an der Röhrenwand zu ESMARCScher Rollkultur gestaltet und die bereits herangewachsenen Kolonien erkennen lassend.

Als Indicator empfiehlt v. RIJMSDIJK ein Stückchen Mull, das in folgende Flüssigkeit getaucht und dann an der Reagensglaswand ausgebreitet wird: 4,2 ccm 10%ige Glucoselösung, 0,1 ccm 0,1 n-Natronlauge, 0,1 ccm Methylblaulösung (0,05 g Methylblau Höchst + 30 g destilliertes Wasser).

Mit dem Fortschreiten der Sauerstoffabsorption bleicht die Farbe der anfangs blauen Gaze bis zur völligen Farblosigkeit ab (durch hinzutretenden Sauerstoff kehrt die blaue Farbe wieder). Dieser Indicator zeigt noch 0,4 mm Sauerstoff an, was für die Praxis vollständig genügt, da auch empfindliche Anaerobier unter solchen Verhältnissen noch wachsen.

### e) Luftverdünnung.

Das Verfahren der Luftverdünnung ist zuerst von PASTEUR angewendet worden. Für Kulturen in Röhren hat eine brauchbare Form GRUBER angegeben

<sup>1</sup> v. RIJMSDIJK: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1922, 88, 229.

(Abb. 32 und 33). Ein starkwandiges Röhrrchen von etwa 17 cm Länge ist in seinem oberen Teil an einer Stelle stark verengt. Man füllt den flüssigen Nährboden mit einem Capillartrichter ein, verschließt mit einem Wattestopfen, sterilisiert und impft nach genügender Abkühlung. Darauf schiebt man den Wattestopfen etwas in das Röhrrchen hinein, verschließt es mit einem Kautschukstopfen mit Ableitungsrohr, evakuiert kräftig, so daß der Nährboden ins Siedengerät und schmilzt die Röhre an der verengerten Stelle ab. Hat man Gelatine angewendet, so kann man diese zu einer ESMARCHSchen Rollkultur verarbeiten. Nach der Entwicklung der Kolonien bricht man zunächst die Spitze des Röhrrchens ab, um etwaigen Druck herauszulassen, schneidet es dann mit dem Diamanten soweit ab, daß man bequem mit dem Platindraht hinein kann, und sticht ab.

Für Plattenkulturen ist von ARTH. MEYER<sup>1</sup> ein sehr brauchbarer Vakuumapparat (Abb. 34) angegeben worden. Er besteht aus einem dickwandigen Gefäß, auf das ein Deckel aufgeschliffen ist, der einen Zweiweghahn trägt. Das Gestell zur Aufnahme der Platten trägt ein Manometer und Thermometer, so daß eine genaue Kontrolle der Druckverhältnisse möglich ist.

Natürlich kann man das Verfahren der Luftverdünnung auch mit dem Absorptionsverfahren mittels Pyrogallol verbinden, indem man auf den Boden des Gefäßes Pyrogallollösung bringt, in die nach dem Evakuieren durch Neigen des Gefäßes ein Stück Kali gestürzt wird. Um die letzten Spuren von Sauerstoff zu entfernen, bringt man zuweilen junge Kulturen Sauerstoff verzehrender Arten in die Kulturgefäße. Als Indicator für das Fehlen des Sauerstoffes eignen sich vorzüglich Kulturen von Leuchtbakterien auf Seewassergelatine, die noch bei Anwesenheit von Spuren dieses Gases leuchten.

Anaerostat nennt KNORR<sup>2</sup> seinen für Vacuum und Überdruck konstruierten Brutschrank für die Anaerobenzüchtung. Nach dem gleichen Prinzip ist der Einsatzanaerostat gebaut, der in jedem Brutschrank Platz finden kann.

#### d) Verdrängung der Luft durch andere Gase.

Zur Verdrängung der Luft durch indifferente Gase hat man Kohlensäure, Wasserstoff, Leuchtgas und Stickstoff benutzt. Von Kohlensäure und Leuchtgas ist man abgekommen, da sie auf viele Pilze schädlich wirken. Stickstoff wäre zweifellos das geeignetste Verdrängungsmittel. Nur ist seine Darstellung etwas unbequem. Man kann ihn durch Erhitzen einer wäßrigen Lösung molekularer Mengen von Natriumnitrit und Salmiak herstellen und im Gasometer auffangen, muß aber sehr vorsichtig erwärmen, damit die Reaktion nicht so heftig verläuft.

Man verwendet daher jetzt fast ausschließlich Wasserstoff, obgleich auch dieser nicht in allen Fällen völlig indifferent zu sein scheint. Zu seiner Darstellung muß reinstes Zink und reinste Schwefelsäure verwendet werden. Man reinigt ihn weiter durch Waschen mit Bleiessig, Silbernitrat und alkalischer

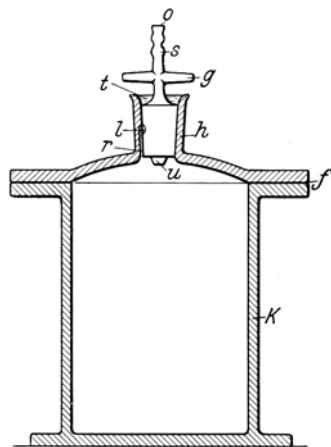


Abb. 34. Kulturvakuum nach ARTH. MEYER. *K* Kulturgefäß, *t* Rand des Kulturgefäßes, *r* Tubus des Deckels, *s* Hahnbolzen, *o* Öffnung des Hahns, *g* zylindrischer Griff des Hahnes, *i* Rinne zum Eingießen des Verschlußmittels, *l* Loch im hohlen Hahnbolzen, *u* unteres Ende des Hahnbolzens.

<sup>1</sup> ARTH. MEYER: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1906, 15, 337.

<sup>2</sup> KNORR: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig. 1930, 117, 154.

Pyrogalllösung von Schwefelsäure, Arsenwasserstoff und Sauerstoff. Der Wasserstoff muß in starkem Strome längere Zeit von untenher durch die Kulturgefäße geleitet werden, wenn alle Luft verdrängt werden soll.

Für Reagensglaskulturen kann man nach FRAENKEL verfahren, der die Röhren (Abb. 35) durch einen Kautschukstopfen mit längerer Zuleitungs- und kürzerer Ableitungsröhre verbindet, die zum Schluß abgeschmolzen werden.

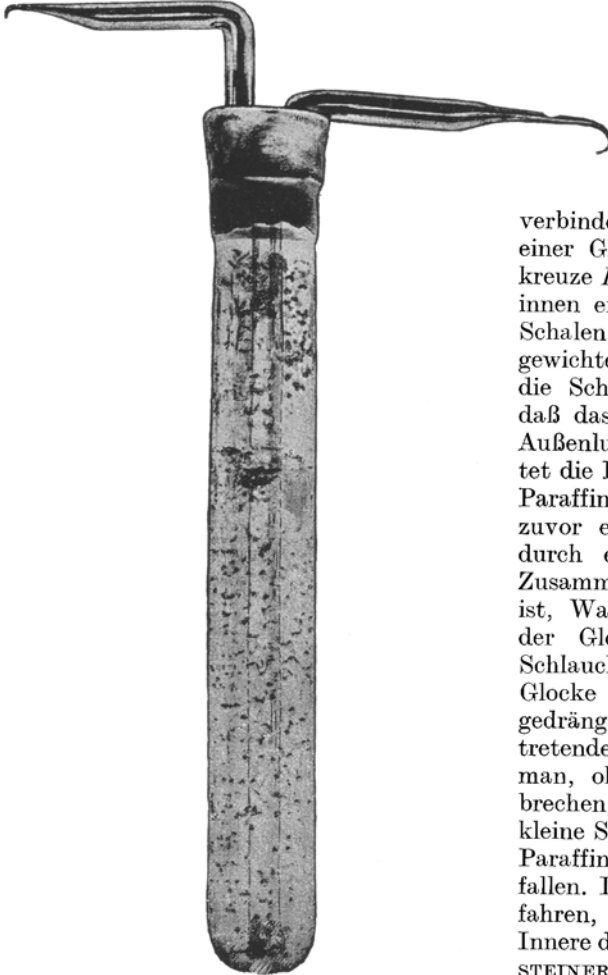


Abb. 35. FRAENKELS Anaerobenröhre (etwas verkleinert). Der Inhalt an der Röhrenwand zu ESMARCHScher Rollkultur gestaltet und die bereits herangewachsenen Kolonien (als schwarze Punkte) erkennen lassend. (Nach FRAENKEL.)

es befindet sich eine ganze Reihe von Apparaten ähnlicher Konstruktion im Handel, die zum Teil auch geeignet sind, das Luftverdünnungsverfahren mit dem Verdrängungsverfahren zu kombinieren.

Von den verschiedenen vorstehend angegebenen Verfahren ist die Züchtung in hoher Schicht nach BURRI das bequemste und billigste.

Bemerkt sei weiter, daß die obligaten Anaerobier in gut ausgekochten, zusagenden Nährböden in hoher Schicht oft auch ohne weitere Vorsichtsmaß-

Andere Röhren und Kolben haben PETRI und MAASSEN angegeben (Abb. 36). Für Plattenkulturen kommt z. B. der von BOTKIN angegebene Apparat in Betracht, der Verdrängungs- und Absorptionsverfahren verbindet (Abb. 37). Er besteht aus einer Glocke *B*, die auf einem Bleikreuz *E* in einer Glasschale *A* steht, innen ein Drahtgestell *D* für PETRI-Schalen enthält und durch Bleigewichte *C* beschwert ist. Man füllt die Schale mit Pyrogalllösung, so daß das Innere der Glocke von der Außenluft abgesperrt ist, überschichtet die Pyrogalllösung mit flüssigem Paraffin und leitet nun durch einen zuvor eingeführten Schlauch *F*, der durch eine Drahtspirale gegen das Zusammengedrücktwerden geschützt ist, Wasserstoff in den oberen Teil der Glocke. Durch einen gleichen Schlauch *G*, der im unteren Teile der Glocke endet, wird die Luft hinausgedrängt. Verbrennt der unten heraustretende Wasserstoff ruhig, so entfernt man, ohne die Gaszufuhr zu unterbrechen, die Schläuche und läßt nun kleine Stücke festes Ätzkali durch die Paraffinschicht in die Pyrogalllösung fallen. Dabei muß man vorsichtig verfahren, damit kein Paraffin in das Innere der Glocke gelangt. Nach KÜRSTENER bewirkt allerdings Paraffin

durchaus keinen sicheren Abschluß gegen den Sauerstoff der Außenluft. Das BOTKINSche Verfahren ist verschiedentlich verbessert worden, und

regeln gedeihen. Einzelstehende Kolonien und damit einwandfreie Reinkulturen von Anaerobiern erhält man aber am sichersten durch die Oberflächenkultur auf der Traubenzuckerblutagarplatte nach ZEISSLER. Die Platten werden am besten in einem zur Evakuierung geeigneten Apparat untergebracht, in dem die Vervollständigung des Sauerstoffabschlusses mit Pyrogalllösung und Ätzkali herbeigeführt wird. Wo eine leistungsfähige Vacuumapparatur nicht zur Verfügung steht, verdient besonders das Verfahren von FORTNER Beachtung.

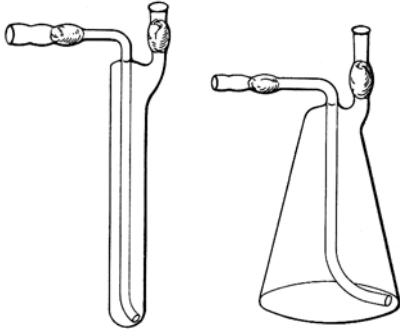


Abb. 36. Röhren und Kolben nach PETRI und MAASSEN.

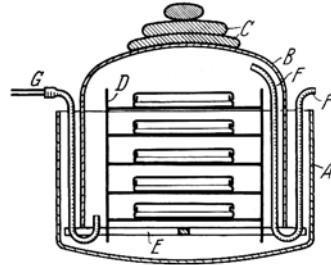


Abb. 37. BOTKINS Apparat zur Züchtung von Anaerobiern auf Platten.

Über einige von LINDNER angegebene Verfahren zur Kultivierung höherer Pilze bei Luftabschluß unter dem Mikroskop vgl. S. 1599 und 1601. Natürlich sind die für Bakterien beschriebenen Verfahren evtl. auch für höhere Pilze zu gebrauchen.

### D. Anwendung der verschiedenen Reinzuchtverfahren.

Die Reinzuchtverfahren eignen sich für die einzelnen Pilzgruppen in verschiedener Weise.

Für höhere Pilze, soweit sie für die Lebensmittelmykologie in Betracht kommen, ist sowohl das KOCHSche Plattenkulturverfahren, wie das HANSENSche Einzellverfahren und die LINDNERSche Tröpfchenkultur zu gebrauchen, und es wird in erster Linie von der Reinheit des Ausgangsmaterials abhängen, welche man anwendet. Ist das Material sehr unrein, so wird man stets die KOCHSche Plattenkultur anwenden müssen. Für Hefenpilze wird man, wenn es sich um Trennung von Hefengemischen handelt, vorteilhaft immer eines der beiden letztgenannten Verfahren verwenden, nur für die Züchtung einzelner Hefezellen aus einem Gemisch, das überwiegend andere Pilze enthält, muß man auf das Plattenkulturverfahren zurückgreifen, wenn nötig unter Einschaltung einer Vorkultur in sauren Nährlösungen. Für Bakterien kommt von den Einzellverfahren wohl nur das von BURRI in Betracht. Im übrigen ist man hier in erster Linie auf das KOCHSche Plattenkulturverfahren angewiesen. In vielen Fällen wird man vorteilhaft eine Anreicherungskultur vorangehen lassen, in manchen ohne solche überhaupt nicht zum Ziele gelangen. Für die Isolierung anaerober Bakterien müssen in der Regel die unter C aufgeführten Methoden Anwendung finden.

### E. Aufbewahrung von Reinkulturen.

Es ist wünschenswert, Reinkulturen von Pilzen für spätere Untersuchungen aufbewahren zu können, um Vergleichsmaterial zur Hand zu haben. Bakterien bewahrt man meist in Form von Kulturen auf festen Nährböden, insbesondere



auf Agar und Kartoffeln auf. Um eine zu schnelle Austrocknung der Nährböden zu vermeiden, kann man die Röhren mit einer Gummikappe verschließen, oder in den Wattestopfen Paraffin gießen. Die Kulturen müssen im Dunkeln und bei möglichst niedriger Temperatur (6—10°) aufbewahrt werden. Selbst dann aber muß von Zeit zu Zeit eine Übertragung auf frischen Nährboden vorgenommen werden. Die Zeit, nach der dies erforderlich wird, schwankt sehr. Bei sporenbildenden Arten kann man mit der Übertragung 1 Jahr und länger warten, muß hier aber stets wieder von abgekochtem Sporenmateriale ausgehen, wenn man Variation möglichst vermeiden will. Bei nicht sporenbildenden Arten empfiehlt es sich, Umimpfungen alle 4—6 Wochen vorzunehmen, da man sonst leicht die Kulturen einbüßt.

Auch für Hefen und andere Eumyceten eignet sich diese Art der Aufbewahrung, doch wird für Hefen besonders in Gärungslaboratorien nach dem Vorschlage von HANSEN 10%ige Saccharoselösung (in Leitungswasser) benutzt, in der ihre Lebensfähigkeit außerordentlich lange erhalten bleibt (vgl. hierzu die Ausführungen KLÖCKER<sup>1</sup>). Als Aufbewahrungsgefäß dienen FREUDENREICH- oder HANSEN-Kolben (vgl. S. 1614).

Wichtig ist es, daß die aus dem Bodensatz einer gärenden Flüssigkeit entnommene Einsaat bei Hefen nicht zu groß und zu klein sei. In letzterem Falle stirbt nach Angaben von WILL die Hefe nach einiger Zeit ab. Bei zu starken Einsaaten findet infolge der Übertragung reichlicher Nährstoffmengen eine starke Vermehrung der Hefe in der Saccharoselösung statt, die zur Erzeugung von Hautvegetationen und dadurch zur Variation führt. WILL empfiehlt als Einsaat einen Tropfen der Bodensatzhefe. Die Kolben müssen trocken und dicht verschlossen aufbewahrt werden. WILL dichtet daher Helm und Kolben gegeneinander noch mit Siegellack ab. Auf das Helmrohr des FREUDENREICH-Kolbens wird vorteilhaft noch ein kurzes S-förmiges Rohr gesetzt. Wenn es nun auch sicher ist, daß die meisten Hefen in Saccharoselösung ihre Lebenskraft und Eigenschaften jahrelang behalten, so empfiehlt WILL doch, die Hefen etwa nach 1 Jahr in Würze aufgären zu lassen und dann erneut in Saccharoselösung zu bringen. Auch bei dieser Art der Aufbewahrung muß die Temperatur möglichst niedrig gehalten werden.

Die meisten Schimmelpilze, ferner *Monilia*, *Oidium*, *Torula*, *Mycoderma*, *Dematium*, *Cladosporium* usw. lassen sich nach KLÖCKER in dieser Weise ebenfalls in 10%iger Saccharoselösung jahrelang aufbewahren.

## V. Keimzählung.

Der Keimgehalt einer Flüssigkeit läßt sich annähernd ermitteln

1. durch Feststellung der unter bestimmten Verhältnissen auf Plattenkulturen wachsenden Kolonien;
2. durch mikroskopische Auszählung mit Hilfe der Zählkammer oder im gefärbten Präparat.

### A. Keimzählung mittels des Plattenkulturverfahrens.

Um die Zahl der entwicklungsfähigen Zellen in einem Keimgemisch festzustellen, bedient man sich meist des Plattenkulturverfahrens, wobei man von der Ansicht ausgeht, daß jede Kolonie einem Keim entspricht. Daß dies nur bis zu einem gewissen Grade zutrifft, ist bereits früher erwähnt worden. Auch vermehren sich geschwächte Keime zuweilen wohl noch in flüssigen, nicht aber auf festen Nährböden. Weiter darf man nicht übersehen, daß die Art

<sup>1</sup> KLÖCKER: Die Gärungsorganismen, 3. Aufl. 1924.

des Nährbodens, die Temperatur und anderes auf die Vermehrungsfähigkeit vieler Arten von entschiedenem Einfluß ist. Daher sind alle auf diese Weise gewonnenen Werte niemals wirkliche, sondern nur relative, die lediglich für den angewendeten Nährboden und die besonderen Kulturverhältnisse gelten. Universalnährböden für diese Zwecke gibt es nicht.

Man verwendet für Zählplatten meist Gelatinenährböden. HESSE empfiehlt für Bakterien besonders HEYDEN-Nährstoffagar. Für Hefen und andere höhere Pilze werden vorteilhaft schwach saure Nährböden, wie Würzelgelatine, verwendet. Die zu untersuchende Flüssigkeit muß zwecks Erzielung einer guten Durchschnittsprobe tüchtig geschüttelt werden. Dann entnimmt man, falls der Keimgehalt nicht zu groß ist, mit einer sterilisierten, in Zehntel Kubikzentimeter geteilten 1 ccm-Pipette sofort eine kleine Probe, pipettiert in sterilisierte PETRI-Schalen 0,1, 0,3 und 1 ccm der Flüssigkeit, gießt den verflüssigten und auf 25 bzw. 40° C abgekühlten Nährboden darüber und vermischt gründlich durch Hin- und Herneigen der PETRI-Schalen. Keimreiches Material ist zunächst in bekanntem Verhältnis (1:10, 1:100 usw.) mit sterilem Leitungswasser, Bouillon oder dgl. zu verdünnen, wobei auf gute Durchmischung besonders zu achten ist. Von jeder Verdünnung werden mindestens zwei Platten gegossen. Bei Agarnährböden kann man auch die Flüssigkeit auf der Oberfläche der zuvor gegossenen Platten verteilen.

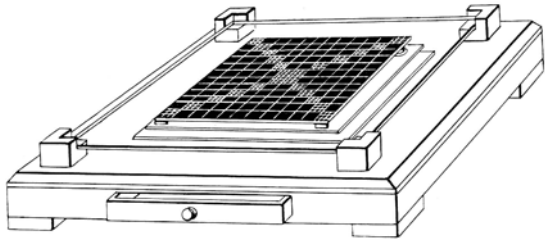


Abb. 38. Zählplatte nach WOLFFHÜGEL.

Gelatinenährböden lassen sich natürlich auch in Form von Rollröhrchen zu Zählplatten verarbeiten. Sie eignen sich besonders für alle diejenigen Fälle, in denen es darauf ankommt, ganz vereinzelte Keime oder die Keimfreiheit einer Flüssigkeit nachzuweisen, da bei ihnen die Gefahr einer Verunreinigung durch Luftkeime am geringsten ist. Außerdem ist dieses Verfahren da besonders wertvoll, wo die Ausführung des immerhin umständlicheren Plattenkulturverfahrens auf Schwierigkeiten stoßen würde.

Die Zählplatten werden unter Lichtabschluß bei etwa 10—22°, Agarplatten auch bei 37° aufbewahrt. Der Abschluß der Zählung wird solange hinausgeschoben, als noch Kolonien auswachsen, was durch Kontrollzählungen festzustellen ist. Praktisch läßt sich diese Forderung bei Gelatinenährböden meist deswegen nicht erfüllen, weil in der Regel peptonisierende Arten die Platten nach einiger Zeit durch Verflüssigung der Gelatine unbrauchbar machen. Über die Verwendung von Höllesteinstift und Salicylsäure zur Verlängerung der Lebensdauer der Gelatineplatten vgl. S. 1580.

Das Auszählen der Kolonien wird bei schwächer bewachsenen Platten mit der Lupe, bei dicht bewachsenen mit dem Mikroskop vorgenommen.

Für die Lupenzählung braucht man außer einer mittelstarken Handlupe mit möglichst großem Gesichtsfeld in der Regel eine besondere Zählplatte. Für die früher gebräuchlichen Glasplatten ist diese viereckig und in Quadrate von etwa 1 cm Seitenlänge geteilt (Abb. 38). Die in den Diagonalen liegenden Quadrate sind meist nochmals in je neun kleinere Quadrate zerlegt. Die Zählplatte liegt über einer schwarzen Glasplatte; manchmal ist auch die Teilung in diese selbst eingätzt. Für PETRI-Schalen ist die aus schwarzem Glas hergestellte kreisrunde Zählplatte nach LAFAR zu verwenden (Abb. 39), die unter

die auszuzählende Platte gelegt wird. Es werden sodann mehrere Sektoren ausgezählt, die jedoch so verteilt sein müssen, daß sich hieraus die gesamte Kolonienzahl der Platte hinreichend genau berechnen läßt.

Man hat auch mit Einteilung versehene Schalen sowie besondere flache Kulturflaschen mit eingezählter Quadrateinteilung hergestellt, die eine Zählplatte überflüssig machen. Bei der von SCHUMBURG angegebenen Konstruktion ist die Kulturflasche zugleich mit einem hohlen Glasstopfen versehen, dessen Höhlung 1 ccm beträgt, so daß man sie zur Abmessung von Flüssigkeiten benutzen kann (Abb. 41).



Abb. 39.  
Zählplatte nach LAFAR.

Schwach bewachsene Platten zählt man unter Lupenkontrolle in der Weise aus, daß man jede gezählte Kolonie auf der Unterseite der Schale durch einen Tintenpunkt markiert, um Doppelzählungen zu vermeiden.

Für Rollröhrchen ist ein besonderer Zählapparat eingerichtet worden, der das Auszählen größerer oder kleinerer Oberflächenteile gestattet (Abb. 40). Meist kommt man aber auch in der

Weise zum Ziel, daß man die Oberfläche des Röhrchens durch Striche mit einem Fettstift in vier Teile teilt und diese nacheinander mit der Lupe auszählt.

Man sollte annehmen, daß die genauesten Ergebnisse zu erwarten seien, wenn man die zu untersuchende Flüssigkeit soweit verdünnt, daß mit der Lupe gut zählbare Platten erhalten werden. Durch die Multiplikation mit einem hohen Verdünnungsfaktor geht jedoch der erhoffte Vorteil wieder verloren<sup>1</sup>, ganz abgesehen davon, daß die Lupenzählung

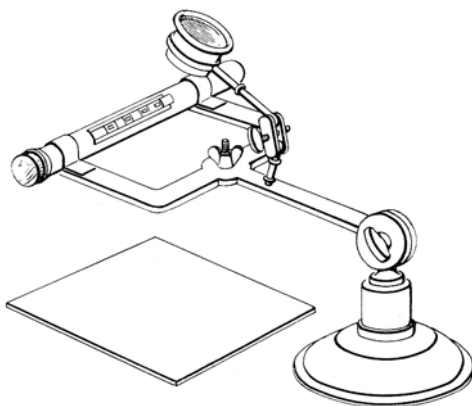


Abb. 40. Zählapparat für Rollröhrchen  
nach ESMARCH.

an sich stets niedrigere Endwerte liefert als die mikroskopische Zählung. So hat KONRICH<sup>2</sup> neuerdings beobachtet, daß bei mikroskopischer Zählung regelmäßig etwa dreimal mehr Keime gefunden werden als bei Lupenzählung. Es empfiehlt sich daher die letztere auf keimarme Flüssigkeiten, die gar nicht oder nur 1:10 verdünnt werden, zu beschränken.

Die mikroskopische Auszählung wird mit schwacher Vergrößerung (etwa 50fach) ausgeführt. Vorbedingung für genaue Zählungen sind PETRI-Schalen mit möglichst gleichen Durchmessern, möglichst ebenem

Boden und scharf rechtwinkelig gebogenem Rande, Nährbodenschichten von höchstens 1,5 mm Dicke, wie man sie bei Verwendung von 8—9 ccm Nährboden in Schalen von 90—94 mm Durchmesser erhält, möglichst gleichmäßige Verteilung der zu untersuchenden Flüssigkeit im Nährboden und horizontale Erstarrung.

<sup>1</sup> Vgl. hierzu z. B. die Ausführungen von BICKERT: Z. 1930, 59, 356; sowie von MUNTSCHE: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1929, 114, 438; Arb. Reichsgesundh.-Amt 1930, 62, H. 1, 159—167.

<sup>2</sup> KONRICH: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1929, 115, 108.

In der Regel zählt man 30—50 Gesichtsfelder aus, die man zuvor durch gleichmäßig verteilte Tuschepunkte markiert hat, und nimmt hiervon das arithmetische Mittel. Aus dem wirklichen Durchmesser eines Gesichtsfeldes (Objektmikrometer!) und dem der PETRI-Schale wird die Gesamtzahl der aufgegangenen Kolonien und sodann aus diesen unter Berücksichtigung der etwa vorgenommenen Verdünnung der Keimgehalt der zu untersuchenden Flüssigkeit berechnet.

Zur Abkürzung dieser Arbeit schlägt KONRICH ein Verfahren vor, bei dem der Flächeninhalt der PETRI-Schale (zu 6350 qmm angenommen) zu der im Mikroskop sichtbaren veränderlichen Fläche in ein festes Verhältnis gesetzt wird, was in folgender Weise geschieht.

Man legt auf eine Nährbodenschicht in einer PETRI-Schale ein Objektmikrometer (Skala auf dem Nährboden), bewehrt das Mikroskop mit schwachem Okular und schwachem Objektiv (Vergrößerung 40 bis 60fach) und stellt durch entsprechendes Ausziehen des Tubus das Gesichtsfeld so ein, daß es 2 mm Durchmesser und somit 3,14 qmm Fläche hat. Das Okular gibt alsdann praktisch genau den 2000. Teil der PETRI-Schale als Gesichtsfeld.

Stehen die Kolonien zu dicht, so kann man ein Okularnetzmikrometer (vgl. S. 487) zum Auszählen der Gesichtsfelder verwenden. Empfehlenswerter ist ein Okular mit geeichter Irisblende, wobei die Eichstriche die jeweils freigegebene mikroskopische Fläche in ein festes Verhältnis zur PETRI-Schalenfläche setzen.

Um das lästige Aufschreiben und Addieren der abgelesenen Kolonien zu vermeiden, verwendet KONRICH zwei kleine Zählmaschinen, von denen das eine zum Zählen der Kolonien, das andere zum Zählen der Gesichtsfelder dient.

Die Untersuchung fester Stoffe auf ihren Keimgehalt stößt auf größere Schwierigkeiten als die von Flüssigkeiten. Es wird sich hierbei nicht empfehlen, die Stoffe, die immer in Pulverform oder in sonstiger feiner Verteilung vorliegen müssen, unmittelbar mit dem Nährboden zu mischen, um Klumpenbildung zu vermeiden. Am besten ist es in diesem Falle, abgewogene Mengen des Stoffes in gemessenen Mengen sterilisierten Leitungswassers aufzuschwemmen und von dieser Aufschwemmung bestimmte Anteile auszusäen. Dabei muß natürlich Sedimentierung der Schwebestoffe während der Entnahme der Impfprouben möglichst vermieden werden.

## B. Keimbestimmung durch unmittelbare mikroskopische Auszählung.

Bei diesen Verfahren werden nicht mehr entwicklungsfähige oder bereits abgestorbene Keime mitgezählt, da es bisher auch mit Hilfe von Färbemethoden nicht möglich ist, lebende und tote Bakterien sicher zu unterscheiden. Der Vorteil gegenüber der Plattenkultur besteht aber darin, daß schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit das Resultat vorliegt und daß diese Verfahren auch dann anwendbar sind, wenn der zu untersuchenden Flüssigkeit keimtötende Mittel (wie Formalin) zugesetzt waren, was z. B. für die Milchuntersuchung von Wichtigkeit ist, während in solchen Fällen das Plattenverfahren völlig versagt.

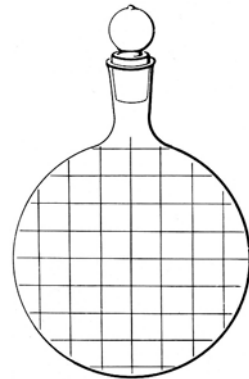


Abb. 41. Kulturflasche nach SCHUMBERG mit Ätzung zum Zählen und mit hohlem Stopfen zum Abmessen der Flüssigkeit.

### 1. Direkte Methoden.

#### a) Zählung der Keime in der Zählkammer (entsprechend der Zählung von Blutkörperchen).

Man versetzt hierbei die keimhaltige Flüssigkeit mit einem Tropfen Carbol-fuchsin und beschickt nach etwa 15 Minuten langer Einwirkung des Farbstoffes mit dem Material eine Zählkammer nach THOMA-ZEISS. Bei der Tiefe der Kammer von 0,1 mm ist infolge der Kleinheit der Keime, die in verschiedenen Ebenen liegen, eine fortwährende Betätigung der Mikrometerschraube erforderlich, was das Auge auf die Dauer sehr anstrengt, wodurch leicht die Genauigkeit der Zählung beeinträchtigt werden kann. Für regelmäßig wiederkehrende Zählungen ist deshalb diese Methode nicht zu empfehlen.

Neuerdings hat STEINER<sup>1</sup> eine Kammer für Bakterienzählungen angegeben, deren Tiefe nur 0,01 mm beträgt, was sicherlich einen Fortschritt gegenüber der alten Zählkammer bedeutet. BICKERT fand mit Hilfe der STEINERSchen Kammer dreimal so viel Keime als mit der THOMASchen Kammer erhalten wurden.

#### b) Auszählung gefärbter Ausstriche.

Das älteste Verfahren dieser Art ist das von KLEIN<sup>2</sup> angegebene, bei dem die mit Farblösung versetzte zu untersuchende Flüssigkeit mit einer Öse auf ein Deckglas bekannten Flächeninhaltes ausgestrichen wird. Aus den Größen: Öseninhalt, Deckglasoberfläche, Größe und Zahl der durchmusterten Gesichtsfelder sowie der Summe der gezählten Bakterien wird der Keimgehalt errechnet.

Verbesserungen des Ausstrichverfahrens sind von verschiedenen Autoren angegeben worden. Die wesentlichste Verbesserung stellt wohl die Methode von BREED-DEMETER<sup>3</sup> dar, die in erster Linie für Milch ausgearbeitet wurde, aber für alle keimreichen Flüssigkeiten geeignet ist.

Mit einer Spezialcapillarpipette (nach BREED) wird 0,01 ccm Flüssigkeit abgemessen und mit Hilfe einer rechtwinkelig gebogenen Platinnadel auf eine Fläche von 1 qcm ausgestrichen. Bei Serienuntersuchungen verwendet man hierzu Spezialobjektträger nach BREED, die, mit Ausnahme von vier Feldern zu je 1 qcm, mattiert sind, oder eine entsprechende schwarze Ausstrichschablone nach DEMETER, die unter einen nur mit mattem Rand versehenen Objektträger gelegt wird. Das Präparat wird in der Flamme nachfixiert und mit Methylenblau gefärbt. DEMETER empfiehlt für die Färbung folgende Lösung: 2 g Methylenblau pulverisiert + 60 ccm Alkohol (95%ig) + 40 ccm Xylol + 6 ccm Eisessig. Das Präparat bleibt 3—4 Minuten in der Lösung, die zugleich fixiert, entfettet und färbt.

Das Mikroskop stellt man mit Hilfe eines Objektmikrometers durch entsprechendes Ausziehen des Tubus so ein, daß ein Gesichtsfeld den Durchmesser von  $20\frac{1}{2}$  Mikrometerteilen = 0,205 mm hat, was einer Fläche von  $\frac{1}{3000}$  qcm entspricht. Findet sich im Gesichtsfeld eine Bakterie, so bedeutet das das Vorhandensein von  $3000 \times 100 = 300\ 000$  Keimen in 1 ccm der untersuchten Flüssigkeit. Man untersucht 20—30 Gesichtsfelder, um so mehr, je weniger Keime sich darin befinden; bei einer größeren Zahl von Keimen im Gesichtsfeld genügen 10 Gesichtsfelder.

<sup>1</sup> STEINER: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1929, 113, 306.

<sup>2</sup> KLEIN: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1900, 27, 834.

<sup>3</sup> K. J. DEMETER: Die mikroskopische Keimzahlbestimmung nach BREED. Südd. Molkerei-Ztg. 1928, 49, 964. — BREED: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1911, 30, 337. — BREED u. BREW: N. Y. Agr. Exp. Stat. Techn. Bull. 1916, Nr. 49. — BREED u. STOCKING: N. Y. Agr. Exp. Stat. Techn. Bull. 1920, Nr. 75; Journ. of dairy science 1921, 4, 39.

## 2. Indirekte Methoden.

Diese Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Verhältniszählung.

WRIGHT<sup>1</sup> geht von einer Flüssigkeit mit bekanntem Zellgehalt (z. B. an roten Blutkörperchen) aus und berechnet aus dem Verhältnis der gezählten Keime zur Zahl der Blutkörperchen den Keimgehalt der Flüssigkeit. In gleicher Weise verwendet FRIES eine Standardflüssigkeit, wozu er eine Aufschwemmung von Hefezellen mit bekanntem Zellgehalt benutzt. Da beide Methoden aber verschiedene Mängel aufweisen — namentlich die relative Größe der Vergleichszellen im Verhältnis zu den Bakterien kann zu Fehlern Anlaß geben —, hat BICKERT<sup>2</sup> ein Verfahren ausgearbeitet, bei dem die Vergleichszellen in ihrer Größe nicht allzusehr von den zu zählenden Objekten abweichen.

Er benutzt hierzu eine mehrere Tage alte, auf Abwesenheit vegetativer Formen geprüfte Kultur saprophytischer Sporen, die zunächst 3—5 Minuten mit gesättigter Silbernitratlösung und nach dem Auswaschen der Silberlösung mit einer aus 2—4 g Pyrogallol, 5 ccm 40%iger Formaldehydlösung und sterilem Wasser (auf 100) bestehenden Lösung behandelt wird. Infolge der sofort eintretenden Reduktion des Silbers färben sich die Sporen tiefschwarz. Nach dem Abspülen der Flüssigkeit wird der „metallisierte“ Sporenrasen vom Nährboden vorsichtig abgenommen und in einer mit Glasperlen gefüllten Schüttelflasche zu einer gleichmäßigen Suspension verarbeitet. Die so gewonnene Standardflüssigkeit wird mit Hilfe der STEINERSchen Kammer wiederholt ausgezählt und dann nach Bedarf verdünnt.

9 Teile der zu untersuchenden Flüssigkeit werden mit 1 Teil der Standardflüssigkeit gemischt und ein Tropfen Carbofuchsin hinzugegeben. Nach einigen Minuten wird nach tüchtigem Durchmischen ein Tropfen der gefärbten Flüssigkeit mit einer Pipette auf einen gut gereinigten Objektträger gebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Das Deckglas wird unter Andrücken rasch mit Wachs umrandet. In der sehr dünnen Flüssigkeitsschicht sind die zu zählenden Bakterien (rot) und Testsporen (schwarz) klar erkennbar.

Die Errechnung des Keimgehaltes ( $x$ ) der zu untersuchenden Flüssigkeit erfolgt nach folgender Formel:

$$x = \frac{\text{Vol. der Testflüssigkeit}}{\text{Vol. der Bakterienflüssigkeit}} \cdot \frac{\text{Summe der gezählten Bakterien}}{\text{Summe der gezählten Testkeime}} \cdot K,$$

wobei  $K$  den Keimgehalt der Testflüssigkeit in 1 ccm bedeutet.

Da es sehr leicht ist, durch entsprechende Verdünnung sich Testflüssigkeiten mit verschiedenem Gehalt an Testkeimen herzustellen und ihren wirklichen Gehalt in der Zählkammer zu ermitteln, ist man stets in der Lage, das Mischungsverhältnis der Test- und der zu untersuchenden Bakterienflüssigkeit so zu gestalten, daß auf einen Testkeim etwa 5—8 Bakterien kommen. Kommen bei der Zählung im Präparat mehr als 15 Bakterien auf einen Testkeim, so besteht die Gefahr, daß beide Zählobjekte nicht gleichmäßig verteilt sind.

Das Verfahren kommt besonders für sehr keimreiche Flüssigkeiten (Milch, Abwässer usw.) in Betracht. Nach BICKERT läßt sich eine Keimbestimmung auf diese Weise in längstens 1 Stunde ausführen, zumal wenn man das Addieren der Zählobjekte durch kleine Zählmaschinen bewerkstelligt.

## C. Untersuchung von Keimgemischen.

Für die Analyse von Keimgemischen kommen in erster Linie das KOCHSche Plattenkulturverfahren in seinen verschiedenen Formen und die Anreicherungskultur in Betracht. Das Plattenkulturverfahren gestattet

<sup>1</sup> WRIGHT: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1921, 86, 90.

<sup>2</sup> BICKERT: Z. 1930, 59, 360—364.

in der bequemsten Weise, einen Überblick über die quantitative Zusammensetzung eines Keimgemisches zu erhalten mit den bereits erwähnten Einschränkungen, die durch die Natur des Nährbodens und die sonstigen Vegetationsverhältnisse gegeben sind. Durch die Anwendung von Nährböden, die auf gewisse chemische Leistungen der Organismen einer Kolonie eigenartig reagieren (Färbungen usw.), läßt sich die Übersicht über die Zusammensetzung von Gemischen oft noch erleichtern.

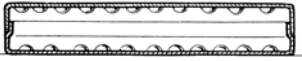


Abb. 42. PETRI-Schale mit Tropfenkultur im Querschnitt.

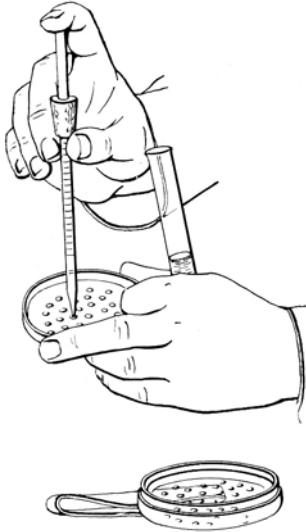


Abb. 43. Anlage einer Tropfenkultur nach LINDNER. Der Gummiring links dient dazu, die Schalen luftdicht abzuschließen, so daß kein Eintrocknen der Tropfen erfolgen kann.

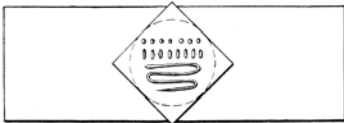


Abb. 44. Tröpfchenkultur im hohlen Objektträger. Die Flüssigkeit in verschiedener Weise aufgetragen.

Das Anreicherungsverfahren kommt dann in Betracht, wenn in der Minderzahl vorhandene Arten oder physiologische Gruppen, die auf den Platten sich nicht entwickeln oder dem Beobachter entgehen würden, nachgewiesen werden sollen.

Einfachere Verfahren zur Analyse von Keimgemischen, besonders von solchen höherer Pilze, die in den Gärungsgewerben eine Rolle spielen, hat LINDNER empfohlen. Diese Verfahren haben sämtlich den Vorteil, daß bei ihnen die Vegetationen der verschiedenen Arten unter dem Mikroskope beständig kontrolliert werden können. Für Gemische verschiedener Bakterienarten eignen sich diese Verfahren weniger. Das älteste dieser Verfahren ist die Tropfenkultur. Die zu untersuchende Flüssigkeit wird soweit mit Wasser oder einer geeigneten sterilen Nährflüssigkeit verdünnt, daß ein aus einer sterilen Pipette fallender Tropfen möglichst nur noch eine Zelle enthält, was durch mikroskopische Voruntersuchung festzustellen ist. Nun besät man sowohl den Boden wie den Deckel einer sterilen PETRI-Schale mit möglichst vielen Tropfen und verschließt die Schale mit einem Gummiband (Abb. 42 und 43), um die Verdunstung zu verhindern. Die Schale bleibt an einem ruhigen Ort stehen und wird von Zeit zu Zeit auf die Vegetation in den einzelnen Tropfen untersucht. Man kann dazu wegen der Dicke des Glases und der Tiefe der Tropfen natürlich nur schwache Vergrößerungen benutzen;

doch läßt sich auch mit diesen, wenn man in der Beurteilung der makroskopischen Erscheinungen in den Tropfen einige Übung gewonnen hat, ein annähernder Überblick gewinnen. Für genauere Untersuchungen bleibt aber nichts weiter übrig, als die Schalen zu öffnen und aus dem Inhalt der einzelnen Tropfen oder aus dem Gemisch aller in üblicher Weise mikroskopische Präparate herzustellen.

Bequemer ist die schon beschriebene Tröpfchenkultur nach LINDNER, die der Tropfenkultur gegenüber allerdings den Nachteil hat, daß mit ihr nur kleinere Flüssigkeitsmengen untersucht werden können. Man kann die zu untersuchende, falls nötig, vorher entsprechend verdünnte Flüssigkeit, wie auf S. 1576 beschrieben ist, in Form von Tropfen oder Strichen oder fortlaufenden Linien (Abb. 44) auf das Deckglas auftragen. Man untersucht die Tröpfchen sofort mikroskopisch und verfolgt dann von Tag zu Tag die sich bei diesem Verfahren gut getrennt entwickelnden Kolonien (Abb. 45).

Ein weiteres Verfahren LINDNERS ist die Adhäsionskultur. Bei dieser wird die keimhaltige Flüssigkeit als dünne Schicht über das völlig entfettete Deckglas ausgestrichen und das Deckglas dann auf den Vaseline ring eines hohlen Objektträgers fest aufgelegt. Um zu starkes Verdunsten der Flüssigkeitsschicht zu verhindern, kann man öfter in die Höhlung oder auf die Unterseite des Deckglases hauchen. Die Adhäsionskultur ergibt gut zusammenhaftende Kolonien der Organismen und ist daher für mikrophotographische Aufnahmen besonders geeignet. Um luftscheue Organismen zur Entwicklung zu bringen, verfährt LINDNER in der Weise, daß er kleinere runde, sterilisierte Deckgläser auf ein Flüssigkeitströpfchen auf der Unterseite eines Deckglases legt. In der dünnen Schicht zwischen den fest adhärierenden Gläsern entwickeln sich luftscheue Organismen gut.

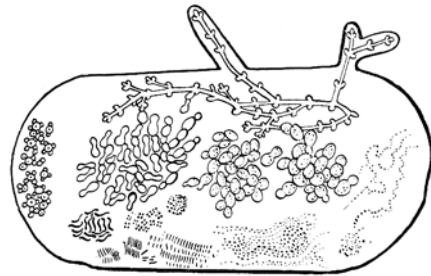


Abb. 45. Entwicklung einer Tröpfchenkultur (schematisch). Links Torula, dann wilde Hefe, zwei Kulturhefen, oben eine Mycelhefe, am unteren und rechten Rande Bakterien. (Nach LINDNER.)

## VI. Charakterisierung eines Pilzes.

Eine genaue Charakteristik eines Pilzes muß sich auf seine Morphologie und Entwicklungsgeschichte, sowie auf seine Physiologie und Biologie erstrecken. Bei vielen höheren Pilzen, die ausgeprägte, charakteristische Fruktifikationsformen besitzen, kann man schon mit den morphologischen Merkmalen und entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen zu einer ausreichenden Charakteristik der Art gelangen. Immerhin geht das Bestreben zur Zeit dahin, auch für die Charakteristik solcher Pilze physiologische und biologische Merkmale nach Möglichkeit heranzuziehen. Bei anderen Arten, deren Fruchtungsformen wenig kennzeichnend oder nicht bekannt sind, muß dagegen Physiologie und Biologie auf das Sorgsamste bei der Charakterisierung berücksichtigt werden. Dies gilt insbesondere auch für die Bakterien. Wie weit man hierbei gehen will, wird von den jeweiligen Umständen und Zwecken der Untersuchung abhängen, je nachdem es auf eine genaue Diagnostik einer Art oder nur auf ihre Familienzugehörigkeit (in morphologischem oder physiologischem Sinne) ankommt. Bestimmte Regeln lassen sich dafür nicht aufstellen. Bei Bakterien und manchen Gruppen höherer Pilze stößt eine genaue Artenabgrenzung selbst bei Heranziehung aller möglichen physiologischen Eigenschaften oft genug noch auf große Schwierigkeiten.

Ganz allgemein beachte man, daß nur solche Ergebnisse vergleichbar sind, die unter völlig übereinstimmenden Versuchsanordnungen erzielt wurden. Wenn irgend möglich, ziehe man sicher bestimmte Kulturen der zu vergleichenden Art zu den Versuchen mit heran; dies wird um so nötiger, je unbestimmter und lückenhafter die früheren Angaben sind.

### A. Morphologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen.

Für morphologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen ist Grundbedingung der Ausgang von einer Zelle bzw. von Reinkulturen. Bei Untersuchungen an Bakterien muß man stets von Reinkulturen ausgehen. Bei höheren Pilzen ist dies nicht immer unbedingt nötig. Auf jeden Fall muß



man aber auch hier zunächst Reinkulturen herstellen, wenn das Ausgangsmaterial sehr unrein ist. Im übrigen wird man bei entsprechender Verdünnung und Verwendung geeigneter Nährböden gelegentlich auch mit dem nicht absolut reinen Material zum Ziele kommen. In den Fällen, in denen auf dem natürlichen Substrat Fruchtungsformen entstehen, die sich in den künstlichen Reinkulturen nicht erzielen lassen, muß man natürlich von ersteren ausgehen.

### 1. Untersuchungen an höheren Eumyceten.

Für entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen höherer Pilze kommt die BREFELDSche Objektträgerkultur und die dieser entsprechende LINDNERSche Tröpfchenkultur in erster Linie in Betracht. Die BREFELDSche Kultur wird so ausgeführt, daß man das Sporenmateriale, das zum Ausgang dient, mittels einer blanken Lanzettstahlnadel, die BREFELD kalt durch Eintauchen in Alkohol sterilisiert, mit größter Vorsicht gegen Verunreinigungen entnimmt, es in abgekochtem Wasser verteilt und soweit verdünnt, daß ein Tröpfchen nur noch eine Spore enthält. Bei sehr kleinen Sporen kann man auch in der Weise verfahren, daß man sie in

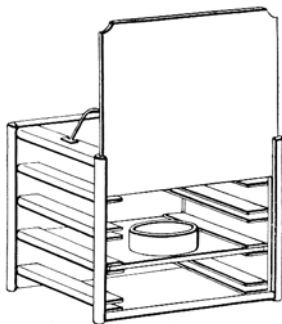


Abb. 46. Gestell für feuchte Kammern und Objektträger.

Nährlösungen in die ersten Stadien der Keimung eintreten läßt, wobei sie meist anschwellen. Sie sind dann leichter zu erkennen. Ein Tröpfchen mit einer Zelle wird auf einem sorgfältig sterilisierten Objektträger in einen Tropfen Nährlösung gebracht. Die Objektträger müssen fettfrei sein, damit sich die Kulturtröpfchen auf ihnen gleichmäßig ausbreiten. Damit die Flüssigkeit nicht verdunstet, werden die Objektträger auf Gestellen aus Zinkblech (Abb. 46) unter Glocken aufbewahrt, die auf Tellern mit genau horizontalen Flächen stehen. Eine 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub>ige Sublimatlösung auf den Tellern schließt die Glocken unten gegen die Außenluft ab. Um eine genügend feuchte Atmosphäre in der Glocke zu erzeugen, wird ihre Innenwand stets mit Hilfe eines Zerstäubers feucht gehalten. Die Glocken werden in Schränken aufbewahrt. Für Kulturen im Thermostaten empfiehlt O. BREFELD hohle Objektträger, in deren Ausschiff der Tropfen gelegt wird.

Die BREFELDSche Objektträgerkultur hat den großen Vorzug, daß sie der Luft freien Zutritt gestattet, was dem Wachstum der höheren Pilze sehr förderlich ist. Andererseits sind natürlich die offenen Tropfen der Verunreinigung durch Luftkeime leicht ausgesetzt, sofern man nicht über ein Zimmer verfügt, in dem wenig verkehrt wird und dessen Wände und Boden leicht gesäubert werden können. Auch eignen sich die Objektträgerkulturen nicht für andauernde Beobachtungen einer Spore unter dem Mikroskop. Man wird daher oft besser die feuchten Kammern verwenden, von denen die BÖTTCHERSche schon beschrieben wurde. Abarten dieser Einrichtung gestatten auch Luft oder andere Gase durch seitliche Röhren in die Kammer zu leiten und so eine Anhäufung der entwicklungshemmenden Kohlensäure zu vermeiden, oder die Entwicklung bei Sauerstoffmangel zu verfolgen. Die Kataloge der Firmen enthalten eine ganze Reihe verschiedener Einrichtungen, unter denen man je nach Aufgabe und Neigung wählen kann. Vor dem LINDNERSchen Tröpfchenverfahren mittels des hohlen Objektträgers hat die Züchtung in der feuchten Kammer die Möglichkeit der ausgiebigeren Atmung und Ernährung voraus.

Die Einzellkulturen müssen entweder andauernd oder von Zeit zu Zeit unter dem Mikroskop beobachtet werden. Um Verunreinigungen der Objekt-

trägerkulturen hierbei zu vermeiden, kann man am Mikroskoptubus einen Schirm befestigen, der von oben fallende Keime auffängt. Zu beachten sind Veränderungen der Größe und Form der Sporen bei der Keimung, Abwerfen der Sporenmembran, Anlage von Zellwänden und Verzweigungen, Entwicklung der Fruktifikationsorgane. Von allen Stadien sind Zeichnungen mittels des Zeichenapparates zu entwerfen, an denen auch die nötigen Messungen vorgenommen werden können.

Der Entwicklung der Pilze in den Tropfenkulturen ist natürlich durch die geringe Menge verfügbarer Nährstoffe eine Grenze gesetzt. Zwar kann man die Entwicklung noch weiter führen, indem man den erschöpften Tropfen mit sterilisiertem Fließpapier aufsaugt und dann durch einen frischen ersetzt. Meist aber wird man die Beobachtungen an Tropfenkulturen durch solche an Massenkulturen auf reicheren Nährböden ergänzen müssen. Für solche Massenkulturen, die nicht unter steter mikroskopischer Kontrolle stehen, darf nur Sporenmateriale aus sicheren Reinkulturen verwendet werden, da sonst schwere Irrtümer unvermeidlich sind, wie die Geschichte der Mykologie gezeigt hat.

Zu den Massenkulturen verwendet man die verschiedensten Nährböden, die oben eingehend beschrieben wurden. Ihr Einfluß auf die Entwicklung und Fruktifikation ist genau festzustellen. In Flüssigkeiten ist besonders auf die Bildung von Oberflächenhäuten (Kahmhäuten) und deren Bau, Färbung usw., auf etwaiges Wachstum in der Flüssigkeit, Auftreten von Sproßmycel u. a. zu achten, wobei gleichzeitig etwaige Veränderungen der Flüssigkeit (Geruch usw.) zu beachten sind. Auch die Häute auf festen Nährböden sind oft durch Struktur, Konsistenz und Färbung kennzeichnend. In älteren Kulturen treten nicht selten Hungerformen, Durchwachsungen auf (vgl. S. 1660 und 1662).

Für bequeme Beobachtung des Verhaltens von Sporen und Mycelien bei Luftabschluß oder unter beschränktem Luftzutritt hat LINDNER sein Verfahren des Vaseline-Einschlußpräparates (Abb. 47) empfohlen. Ein Tropfen Nährflüssigkeit mit einigen Sporen wird auf einem sterilisierten Objektträger mit einem sterilisierten Deckglas bedeckt. Bei druckempfindlichen Objekten werden vorher auf den Objektträger einige sterilisierte Sandkörnchen gegeben, gewöhnlich genügen aber schon Vaseline-tupfen an den Ecken des Deckgläschens. Um den Rand des Deckglases zieht man einen Vaselineering und schließt so die Luft ab. Die Sporen keimen unter diesen Verhältnissen zwar, das Wachstum des Mycels hört aber meist bald auf. Oft unterscheidet sich so gewachsenes Mycel in der Form und Verzweigung wesentlich von dem bei Luftzutritt entstandenen. Bei manchen Arten bildet sich Sproßmycel und es ist Gasbildung (Gärung) zu beobachten.

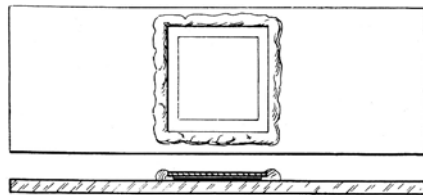


Abb. 47. Vaselineeinschlußpräparat.  
(Nach LINDNER.)

## 2. Untersuchungen an Sproßpilzen<sup>1</sup>.

Eine besondere Betrachtung verdienen unter den Eumyceten die Sproßpilze, die in den Nahrungsmittelgewerben eine wichtige Rolle spielen. Gestalt und Vermehrungsweise dieser Pilze sind sehr einförmig, und es muß daher zur Kennzeichnung jedes andere morphologische Merkmal, insbesondere die Wachs-

<sup>1</sup> Vgl. hierzu auch die ausführliche Darstellung der Eigenschaften der Sproßpilze im speziellen Teil des Werkes unter Hefe.

tumerscheinungen der Massenkulturen herangezogen werden. Die Entwicklungsgeschichte dieser Pilze wird, wie die der anderen Eumyceten, unter mikroskopischer Kontrolle in der feuchten Kammer verfolgt. Zu beachten ist die Größe und Form der Zellen, die Anlage und Dauerhaftigkeit der Sproßverbände, etwaige fadenmycelartige Bildungen, der Inhalt der Zellen (homogene oder körnige Struktur, Vakuolen, Fett, Glykogen, Zellkern), Struktur des schließlich entstehenden Hefefleckes, etwaiges Luftmycel in älteren Kulturen, Bildung von Endosporen, etwaige Kopulationsvorgänge, Alterungserscheinungen der

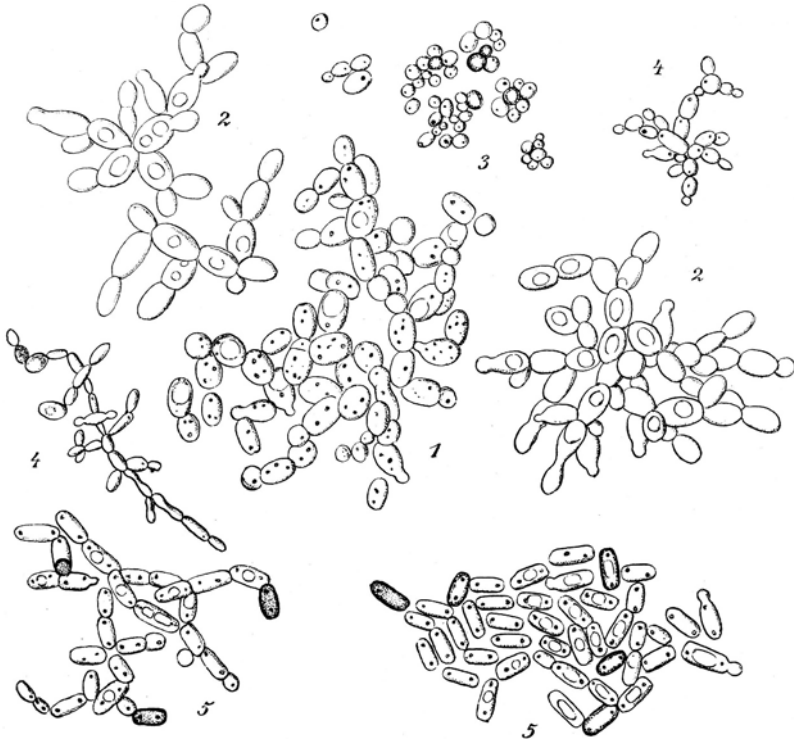


Abb. 48. Wachstum verschiedener Sproßpilze in Tröpfchenkulturen (590:1). (Nach WILL.)  
1 untergärrige Kulturhefe; 2 wilde Hefe; 3 und 4 Torulahefen; 5 Mycodermahefen. In 3, 4, 5 [die stärker umrandeten Zellen mit Luftfülle.

Zellen u. a. m. Bei Kulturen in Gelatine ist die Form der entstehenden Kolonie zu beachten.

Sehr kennzeichnende Wachstumsbilder verschiedener Sproßpilzarten liefert die LINDNERSche Tröpfchenkultur (vgl. Abb. 45).

Bei den Saccharomyceten und anderen Sproßpilzen ist verschiedentlich eine große Neigung zur Variation beobachtet worden, die sich auch auf die morphologischen Merkmale, wie Zellform und Sporenbildung, erstreckt. Deshalb stelle man von einer gärenden Würzekultur nochmals Tröpfchenkulturen her, in denen möglichst viele Tröpfchen nur eine Zelle enthalten. Auch in Oberflächenkulturen sollen nach BELJERINCK bei manchen Saccharomyceten (*S. fragans*, *Schizosaccharomyces octosporus*) morphologische Varietäten durch Form und Farbe der Kolonien zu unterscheiden sein.

Die Sporenbildung ist ein wichtiges differentialdiagnostisches Merkmal. Die Sporen bilden sich bei manchen Arten sehr leicht in Tröpfchenkulturen, Kahlmhäuten, auf festen Nährböden, bei anderen schwieriger und erst unter

besonderen Bedingungen. Dazu gehören im allgemeinen kräftige Zellen, poröse feuchte Unterlagen und reichliche Luftzufuhr. Man läßt daher die auf Sporenbildung zu untersuchende Reinkultur zunächst einen Tag lang in einem Kölbchen mit 10 ccm Würze stehen, gießt die Würze vom Bodensatz, füllt neue auf und läßt nun einen Tag bei 25° gären. Der Bodensatz wird dann mit möglichst wenig Würze auf einen Gipsblock übertragen und hier dünn ausgebreitet. Die Gipsblöcke werden nach LINDNER so hergestellt, daß man einen Brei aus gleichen

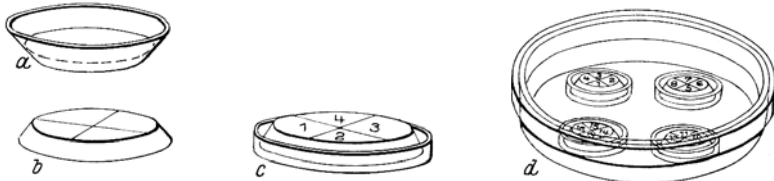


Abb. 49. Apparate zur Sporenkultur der Hefe auf Gipsblöcken. (Nach LINDNER.) a) Blechform zum Gießen des Gipsblockes, b) Gipsblock, c) Gipsblock in einem Schälchen mit Wasser, d) feuchte Kammer mit mehreren Gipsblockschälchen.

Teilen gebranntem Gips und Wasser in vernickelte Blechformen gießt und darin erstarren läßt (Abb. 49). KLÖCKER empfiehlt ein Gemisch von 2 Teilen Gipspulver und  $\frac{3}{4}$  Teilen Wasser, WILL 3 Teile Gips und 1 Teil Wasser. Als Dimensionen für den Block gibt KLÖCKER 3 cm Höhe, Durchmesser der unteren Fläche 5,3 cm, der oberen Fläche 3,8 cm an. Die Gipsblöcke werden in Doppelschalen mit etwas Wasser (Abb. 50) oder nach LINDNER zu mehreren in einer feuchten Kammer (Abb. 49d) aufbewahrt. Nach KLÖCKER werden die Schalen mit den getrockneten Gipsblöcken 1—1 $\frac{1}{2}$  Stunden bei 110—115° sterilisiert und vor dem Gebrauch mit so viel sterilisiertem Wasser angefeuchtet, daß der Boden der Dose noch 2—3 mm hoch damit bedeckt ist.

Um Sporenkulturen unter Bedingungen auszuführen, die Bakterieninfektion ausschließen, schlägt SCHÖNNING die Aufbewahrung der Gipsblöcke im Gärbolben vor. Eine genaue Vorschrift für die Herstellung solcher Sporenkulturen gibt KLÖCKER in seinem wiederholt genannten Lehrbuche. FUHRMANN und PRIBRAM<sup>1</sup> verwenden für diese Zwecke Gipsstreifen, die in Reagensgläser gebracht und in diesen 1 Stunde im Trockenschrank bei 110° erhitzt werden.

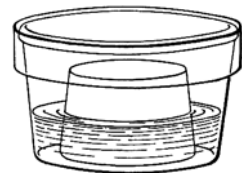


Abb. 50. Gipsblock in einer Glasschale mit Wasser. (Nach KLÖCKER.)

Sporenbildung findet nicht bei allen Sproßpilzen, sondern nur bei den Saccharomyceten statt. Sie ist daher ein wichtiges differentialdiagnostisches Merkmal. Form und Zahl der Sporen (Abb. 51), die Vorgänge, die ihrer Entstehung voraufgehen, der Bau der Sporenwand, die Keimung der Sporen sind bei Saccharomycesarten sehr verschieden und müssen genau beachtet werden. Doch ist andererseits zu bemerken, daß die Bedingungen für die Sporenbildung bei vielen Sproßpilzen noch zu wenig erforscht sind und daß manche bisher asporogene Art unter geeigneten Bedingungen wohl Sporen bilden wird. Ferner ist die Fähigkeit zur Sporenbildung sehr der Variation unterworfen. HANSEN hat durch längere Kultur bei höheren Temperaturen Mutationen mit dauerndem Sporenverlust erzielt. Über die Bedeutung der Temperaturen für die Sporenbildung der Saccharomyceten vgl. man S. 1616.

Nach FUHRMANN und PRIBRAM<sup>1</sup> bekommt man mit Hilfe der Gipsblock- und Gipsstreifenmethode auch bei Bakterien eine außerordentlich rasche und prompte Sporenbildung.

<sup>1</sup> FUHRMANN u. PRIBRAM: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. XII, 1, S. 550.

Wertvolle Unterscheidungsmerkmale für die Sproßpilze bieten die Wachstumserscheinungen auf festen Nährböden. Über die Oberflächenplatten wurde oben schon berichtet. Es kommen weiter in Betracht Strichkulturen, Stichkulturen und Riesenkolonien. Für die Strich- und Stichkulturen verwendet man die Nährböden in Reagensgläsern, oder nach LINDNER'S Vorschlag in vier-eckigen Flaschen (Abb. 54) und Zylindergefäßen (Abb. 53).

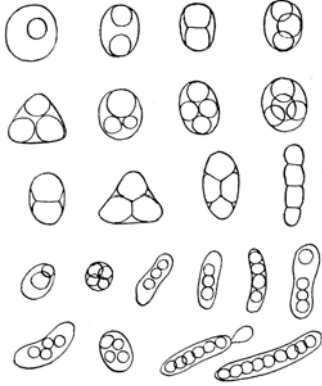


Abb. 51. Zahl der Sporen und Lage- rung in der Mutterzelle. (Nach WILL.)

Strichkulturen legt man durch Verstreichen geringer Mengen Reinkultur auf der Oberfläche, Stichkulturen durch Einstechen eines geraden Platindrahtes, an dessen Spitze eine Spur Hefe sitzt, in einem im aufrechtstehenden Röhrchen oder Fläschchen erstarrten Nährboden an.

Bei den Strichkulturen werden je nach der Dicke der Nährbodenschicht (vgl. Abb. 53 und 54) dickere oder dünnere Massenkulturen entstehen, deren Ränder und Oberfläche oft kennzeichnende Bilder ergeben. Auch die Stichkulturen zeigen oft interessante Wachstumserscheinungen (Abb. 55).

Werden zu diesen Kulturen zuckerhaltige Gelatinenährböden verwendet, so treten auch Gärungsvermögen durch Gasblasenbildung und proteolytische Enzyme durch Verflüssigung der Gelatine in die Erscheinung.

Als Riesenkolonien bezeichnet LINDNER die Kolonien, die sich auf Würzelgelatine aus einem Tropfen einer Hefenaufschwemmung entwickeln. Da ihre Bildung längere Zeit in Anspruch nimmt, so werden sie in Glaskolben angelegt, deren Boden mit einer etwa 2 cm dicken Gelatineschicht (10%ige Würze- oder Kartoffelsaftgelatine) bedeckt ist (Abb. 56). Die Impfung erfolgt durch Auftragung eines Tropfens auf die Oberfläche, ohne diese zu verletzen. Die Kolben müssen vor einseitiger Erwärmung geschützt werden. Es empfiehlt sich, solche Kulturen bei verschiedenen Temperaturen anzusetzen. Die Riesenkolonien besitzen einen sehr interessanten, für die einzelnen Arten kennzeichnenden Bau (Abb. 57 a—g). WILL<sup>1</sup>, der sich eingehend mit ihrem Aufbau beschäftigt hat, stellt sie in Parallele mit der Kahmhaut auf flüssigen Nährböden.

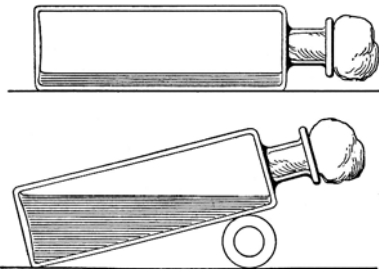


Abb. 52. Kulturflaschen mit gerade und schräg erstarrtem Nährboden. (Nach LINDNER.)

Wegen der Beständigkeit ihrer Wachstumsformen bezeichnet er sie als sehr wertvolles diagnostisches Merkmal einer Art. Nur muß beachtet werden, ob von einer Bodensatz- oder Kahmhautzelle ausgegangen wird.

Wichtig für die Kennzeichnung der Hefen ist ferner das Verhalten in Nährflüssigkeiten. Manche Arten bilden sofort (*Mycoderma*, *Torula*, *Willia*), andere langsamer Oberflächenvegetationen, Kahmhäute. Einzelne Arten bilden ganz dünne, mattgraue, andere dicke wulstige, bröcklige bis klebrige, noch andere mehlartig trockene oder glänzende, knorpelig feste Häute. Man erzeugt solche Hautkulturen in ERLÉNMEYER-Kolben, die bei verschiedenen Temperaturen ohne Erschütterung aufbewahrt werden. Die Hautbildung ist wie

<sup>1</sup> H. WILL: Anleitung zur biologischen Untersuchung usw., S. 112. München u. Berlin 1909.

die Sporenbildung in hohem Maße von der Temperatur abhängig. Die Zellen der Häute mancher Saccharomyceten unterscheiden sich zuweilen wesentlich von denen des Bodensatzes; es treten sog. Dauerzellen auf, die durch eine feste



Abb. 53. Impfstreichkultur auf dünner Gelatineschicht.

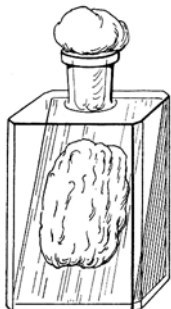


Abb. 54. Strichkultur auf schräg erstarrtem Nährboden.



Abb. 55. Stichkultur in Nährgelatine mit Gasblasen.



Abb. 56. Kolben mit Riesenkolonien auf Gelatine.

(Nach LINDNER.)

Membran, reichen Gehalt an Öl und Glykogen, sowie durch eine lange Lebensdauer gekennzeichnet sind. Bei ihrem Auskeimen entwickeln sich auch typisch gegliederte Mycelien mit einzelnen sehr stark gestreckten Zellen.

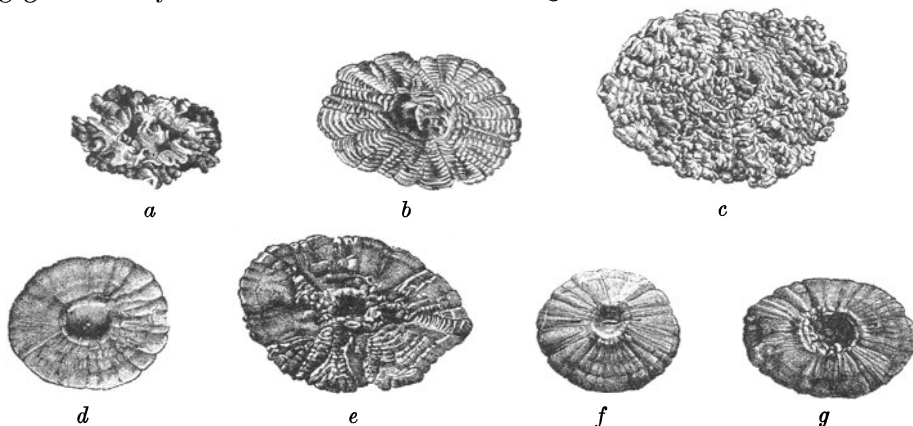


Abb. 57a-g. Riesenkolonien verschiedener Saccharomyceten. (Nach LINDNER.)

### 3. Untersuchungen von Bakterien.

Da der Bau der Spaltpilzzellen und ihrer Sporen, soweit solche vorkommen, sehr einfach und einförmig ist, so müssen alle morphologischen Merkmale der Zellen wie der Massenkulturen zur Kennzeichnung herangezogen werden. Daran muß sich stets eine eingehende Untersuchung der physiologischen und biologischen Eigenschaften schließen. Die Forderung völlig gleicher Versuchsanordnung bei vergleichenden Untersuchungen und die Heranziehung von Vergleichskulturen muß bei bakteriologischen Untersuchungen besonders scharf gestellt werden. Bei sporenbildenden Arten muß der Entwicklungsgang von der Spore bis zur Sporenbildung verfolgt werden. Dies kann man entweder im hängenden Tropfen unter steter mikroskopischer Kontrolle oder nach dem Vorschlage von ARTH. MEYER durch zeitweilige Entnahme einer Probe von der mit den Sporen geimpften Fläche eines schräg erstarrten Agarröhrchens vornehmen. Zu beachten ist dabei, daß die Bakterien auf den in den Laboratorien

benutzten Nährböden häufig erst nach einiger Zeit in bezug auf Zellform und Wachstum in Massenkulturen konstante Eigenschaften annehmen, die für die Diagnose verwendbar sind. Bei sporenbildenden Arten geht man von reinem Sporenmaterial aus. Für Bodenbakterien empfiehlt ARTH. MEYER die Benutzung von mindestens 4 Wochen altem Sporenmaterial, das, in Wasser aufgeschwemmt, genau 2 Minuten im Wasserbade auf 100° erhitzt wurde. Bei anderen Arten, deren Sporen gegen Erhitzung weniger widerstandsfähig sind, wird man entsprechend niedrigere Temperaturen wählen müssen, um die vegetativen Formen zu beseitigen. Man beobachtet nun die Form der Sporen, etwaige Skulptur der Membran und zeichnet mittels des ABBESCHEN Apparates (S. 485) eine größere Zahl der in einem Gesichtsfelde liegenden Sporen. Bei der Vergleichung der Bilder und ihrer Maße wird sich dann ergeben, welche Formen und Dimensionen die häufigeren sind.

Von dem Sporenmaterial wird sodann ein Tropfen auf schräg erstarrten Nährboden, gewöhnlich Agar, oder in Bouillon oder andere Nährlösung gebracht und bei 18 oder 30° gehalten. Man kann auch das Sporenmaterial im hängenden Tropfen aussäen und von Zeit zu Zeit oder beständig unter dem Mikroskop beobachten. Für höhere Temperaturen muß man einen heizbaren Objektisch (vgl. S. 474) oder Mikroskopthermostaten benutzen.

Von den Kulturen entnimmt man etwa alle 6 Stunden aus dem oberen, mittleren und unteren Teil eine kleine Menge mittels des Platindrahtes, verteilt sie in einem Wassertropfen und mikroskopiert. Es muß hierbei die Art der Sporenkeimung verfolgt werden, etwaiges Anschwellen der Sporen, die Zeit, nach welcher die Keimung erfolgt, wie das Keimstäbchen aus den Sporen heraustritt, ob diese als Ganzes zum Keimstäbchen wird, ob das Keimstäbchen sofort schwärmt. Das Austreten des Keimstäbchens erfolgt entweder polar oder äquatorial, bei manchen Arten nach beiden Formen. Die Art der Sporenkeimung variiert bei derselben Art bis zu einem gewissen Grade und ist daher zwar ein wichtiges, aber kein ausschlaggebendes diagnostisches Merkmal. Dann muß die weitere Entwicklung des vegetativen Stadiums verfolgt werden, ob vielleicht an den Stäbchen Verzweigungen auftreten, ob längere ein- oder mehrzellige Fäden entstehen, ob die fertigen Stäbchen längere Zeit im Verbands bleiben oder sich trennen, ob und wann Schwärmer auftreten, und wie die Geißeln an diesen angeordnet sind. Die Untersuchungen werden an lebendem Material sowie an solchem, das nach dem auf S. 529 beschriebenen Verfahren gefärbt wurde, ausgeführt. Ferner sind mittels der auf S. 532 angegebenen Verfahren etwaige Inhaltsstoffe in den Stäbchen festzustellen. Von allen vegetativen Zuständen sind exakte Zeichnungen zu entwerfen. Sodann wird die Sporenbildung genau verfolgt, indem man aus den Kulturen die verschiedenen Stadien bis zur fertigen Spore zusammensucht. Die Zeit, die zwischen Sporenkeimung und Sporenbildung bei einer gewissen Temperatur liegt, ist genau festzustellen. Bei Arten, von denen Sporen auf den üblichen künstlichen Nährböden nicht erzielt werden können, muß man sich natürlich auf die Kennzeichnung der vegetativen Formen beschränken.

Die Form der Kolonie bei Massenwachstum wird für die Unterscheidung der Bakterienarten in hohem Maße benutzt. Sollen die Unterschiede diagnostischen Wert haben, so müssen die Kulturen mit absolut gleichbehandeltem Material hergestellt und unter gleichen Lebensbedingungen gehalten werden. Folgende Formen des Massenwachstums werden besonders herangezogen:

a) Kolonien, die aus einer Zelle in Plattenkulturen entstanden sind. Man benutzt als Nährböden in erster Linie Nährgelatine, in zweiter Agar, in Form von Guß- oder Oberflächenplatten. Besonders kennzeichnend sind die Kolonien auf Gelatine. Man hat zu unterscheiden zwischen Oberflächen-

und Innenkolonien. Erstere sind die charakteristischen, letztere nähern sich bei den meisten Arten mehr oder minder der Kugel- oder Linsenform. An den Kolonien ist zu beachten die Gestalt, der Rand, die Form und das Aussehen der Oberfläche, die Konsistenz, die Farbe, die innere Struktur, ferner etwaige Veränderungen im Nährboden (Verflüssigung der Gelatine, Krystallablagerungen) Gerüche, Leuchten u. a. Doch ist zu beachten, daß die Morphologie der Kolonien in hohem Maße von geringen Verschiedenheiten des Nährbodens abhängt<sup>1</sup>.

b) Strichkulturen, d. h. auf der Oberfläche schräg erstarrter Gelatine- oder Agarnährböden in Röhren oder Flaschen oder auf Scheiben anderer fester Nährböden, wie Kartoffeln, Möhren, Rüben gewachsene Massenkulturen. Es sind dieselben Erscheinungen wie bei den Kolonien zu beachten. Strichkulturen werden durch Verstreichen der Impfmasse mittels der Platinnadel oder -öse hergestellt.

c) Stichkulturen. Diese werden angelegt, indem man mit der Platinnadel, an deren Spitze sich eine sehr geringe Menge Bakterienkultur befindet, in gerade erstarrte Gelatine- oder Agarnährböden im Reagensglase senkrecht zentral einsticht, wobei man das Glas mit der Öffnung schräg nach unten hält, um eine Infektion durch Luftkeime möglichst zu verhüten. Der Stich wird fast bis zum Boden durchgeführt. Es muß so wenig Bakterienkultur verwendet werden, daß man im Nährboden den Stich nicht etwa als weißliche Linie sehen kann. Zu beachten ist, ob die Bakterien sich in der ganzen Länge des Stiches entwickeln, ob das Wachstum überall gleichmäßig ist, ob stellenweise oder an der ganzen Länge Ausläufer in den Nährboden hineinstrahlen, ob Oberflächenwachstum stattfindet, Verflüssigung, Gasbildung, Färbung u. a. eintritt.

d) Massenkulturen in Flüssigkeiten. Diese werden meist mit Nährlösungen in Reagensgläsern ausgeführt, in die man kleine Mengen Bakterienkultur mittels der zuvor durch Abglühen sterilisierten Platinöse überträgt. Zu beachten ist, ob die Flüssigkeit sich trübt oder klar bleibt, ob Oberflächenwachstum (Kahmhautbildung) eintritt, ob sich ein Bodensatz bildet.

## B. Physiologische Untersuchungen.

### 1. Nährstoffbedürfnis und Assimilationsvermögen.

Einen schnellen Überblick über das Assimilationsvermögen eines Pilzes gegenüber verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen gestattet das auxanographische Verfahren von BEIJERINCK. Man stellt aus Gelatine, die durch mehrtägiges Auslaugen in destilliertem Wasser von löslichen Stoffen möglichst befreit worden ist, eine 7%ige Lösung in Wasser mit 0,025% Dinatriumphosphat her. Aus dieser Stammgelatine stellt man Nährgelatinen her, die nur eine Stickstoff- oder eine Kohlenstoffverbindung enthalten, z. B. eine mit 1% Glucose, eine andere mit 0,5% Ammoniumsulfat, impft ein Röhrenchen von jeder mit einer reichlichen Menge der zu untersuchenden Pilzart und gießt Platten. Die Glucose-Phosphatplatte dient nur zur Feststellung der assimilierbaren Stickstoffquellen, die Ammon-Phosphatplatte zur Ermittlung der aufnehmbaren Kohlenstoffverbindungen. Die zu untersuchenden Körper werden gelöst und als Tropfen auf die Platte gebracht. Die Lösungen diffundieren dann in kreisförmigen Feldern in die Gelatine. Enthalten sie assimilierbare Stoffe, so tritt auf den Diffusionsfeldern Wachstum der eingesäten Keime ein. Man kann in dieser Weise die verschiedenartigsten Kombinationen prüfen. Um die Brauchbarkeit stickstoffhaltiger organischer Verbindungen zur Deckung

<sup>1</sup> Über den Einfluß der verschiedenen Faktoren auf die Form der Kolonie vgl. HUTCHINSON: Zentralbl. Bakteriologie II. Abt., 1907, 17, 65; dort findet sich auch die ältere Literatur über diesen Gegenstand. — ALMAGIA: Arch. Hygiene 1906, 59, 159.



des Kohlenstoff- und Stickstoffbedarfes zu prüfen, verwendet man die Phosphatgelatine ohne weiteren Zusatz. Für gelatineverflüssigende Arten verwendet man Agarnährböden.

Das auxanographische Verfahren gibt auch einen Überblick über den relativen Nährwert der geprüften Stoffe. Soll der Einfluß gewisser quantitativer Verhältnisse und der Reaktion festgestellt werden, so muß man natürlich mit Nährlösungen bekannter Zusammensetzung arbeiten. Man vergleiche in dieser Beziehung die Angaben auf S. 1571.

Besondere Vorsichtsmaßregeln sind bei Versuchen über den Bedarf der Pilze an bestimmten Elementen nötig. Die dazu verwendeten Rohstoffe müssen absolut rein sein, und als Kulturgefäße dürfen nur solche aus Jenenser Glas verwendet werden. Sogar auf den Einfluß der Laboratoriumsluft ist unter Umständen Rücksicht zu nehmen.

## 2. Erzeugung von Enzymen.

Die Bildung von Enzymen ist eine Eigenschaft, die als diagnostisches Merkmal gut zu verwenden ist. Doch ist zu beachten, daß diese Fähigkeit unter Umständen verloren gehen oder geschwächt werden kann und daß die Enzymbildung in hohem Grade von den Ernährungsbedingungen abhängt.

Man unterscheidet Ekto- und Endoenzyme. Erstere werden von den Pilzen ausgeschieden, letztere sind an die Zelle gebunden. Von den Endoenzymen kennt man zur Zeit nur wenige genauer, wie die Zymase und Carboxylase der Hefe, die Alkoholoxydase der Essigsäurebakterien, das Milchsäureenzym der Milchsäurebakterien, die Endotryptase der Hefe. Den Nachweis dieser Enzyme an sich führt man zu Zwecken der Diagnostik kaum. Er ist nur mittels des Preßsaftes, der aus den durch Verreiben mit Glasstaub oder Kieselgur zerstörten Zellen hergestellt werden kann, oder mittels der durch Eintragen in Aceton oder Toluol vorsichtig getöteten Zellen möglich. Über die Technik vergleiche man die Angaben von E. und H. BUCHNER und HAHN<sup>1</sup>, E. BUCHNER und GAUNT<sup>2</sup>, E. BUCHNER und MEISENHEIMER<sup>3</sup>, ABDERHALDEN und PRINGSHEIM<sup>4</sup>. Meist beschränkt man sich beim Nachweis dieser „Gärungsenzyme“ auf die durch die lebenden Organismen hervorgerufenen Gärungen (vgl. S. 1614).

Auch beim Nachweis der von den Pilzen ausgeschiedenen spaltenden, oxydierenden und reduzierenden Enzyme beschränkt man sich häufig auf den Nachweis der Wirkung der lebenden Zellen. Indessen ist die Methodik für viele dieser Enzyme soweit ausgearbeitet, daß man auch die Wirkung des Enzyms unabhängig von der lebenden Zelle verfolgen kann.

Ein sehr bequemes, für viele Enzyme anwendbares Verfahren ist das besonders von EIJKMANN<sup>5</sup> ausgearbeitete Diffusionsverfahren, das sich an die auxanographischen Verfahren BELJERINCKS eng anschließt und auch von WIJSMANN für den Nachweis von Enzymen benutzt worden ist. Es stützt sich auf die Beobachtung, daß sich Lösungen verschiedener Krystalloide wie Kolloide in Agarnährböden verbreiten.

Der hohe Wert dieses Verfahrens beruht darin, daß es ziemlich schnell zum Ergebnis führt und die mikroskopische Beobachtung der Enzymwirkung gestattet. EIJKMANN hat dies Verfahren für Casein, Elastin, Fett und Stärke

<sup>1</sup> E. u. H. BUCHNER u. HAHN: Die Zymasegärung. München u. Berlin 1903.

<sup>2</sup> E. BUCHNER u. GAUNT: Liebigs Ann. 1906, 149, 140.

<sup>3</sup> E. BUCHNER u. MEISENHEIMER: Liebigs Ann. 1906, 149, 125.

<sup>4</sup> ABDERHALDEN u. PRINGSHEIM: Zeitschr. physiol. Chem. 1910, 65, 180.

<sup>5</sup> EIJKMANN: Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig., 1901, 29, 841.

spaltende, sowie für Blutkörperchen lösende Enzyme ausgearbeitet. Die einzelnen Arbeitsweisen seien hier nach den Angaben EIJKMANNs aufgeführt.

Caseinspaltende Enzyme. 2%iger Bouillon- oder Salzwasseragar wird in flüssigem Zustande mit sterilisierter Magermilch im Verhältnis von 6:1 bis 3:1 vermischt und sofort in PETRI-Schalen ausgegossen. Auf diese Milchagarplatten impft man den zu prüfenden Pilz oder bringt einen Tropfen einer Kultur desselben, die mit Thymol oder Chloroform versetzt oder keimfrei filtriert worden ist, darauf. Sind caseinspaltende Enzyme vorhanden, so wird der Agar um die Pilzkolonie herum oder an der Stelle des Tropfens aufgehellt, weil sich das Casein löst. Nach EIJKMANN ist casein- und gelatinelösende Wirkung stets gleichzeitig vorhanden.

Elastinspaltende Enzyme<sup>1</sup>. Kalbslunge wird fein gehackt, bei 37° mehrere Tage abwechselnd mit verdünnter Kalilauge und verdünnter Essigsäure digeriert, gewaschen, getrocknet, fein gepulvert und durch diskontinuierliche Erwärmung auf 90° sterilisiert. Eine Aufschwemmung des Elastins in Agar wird zu Platten verarbeitet. Elastinlösende Pilze geben auf solchem Nährboden einen deutlichen Aufhellungshof.

Stärkelösende Enzyme (Diastasen). Reisstärke wird in durch Kochen gequollenem Zustande mit Nähragar gemischt, so daß ein schwach getrüberter Nährboden entsteht. Stärkelösende Kolonien umgeben sich bald mit einem hellen Hof. Gießt man verdünnte Jodjodkaliumlösung auf die Platte aus, so wird die Platte in der Umgebung solcher Kolonien rot, im übrigen blau gefärbt.

Fettspaltende Enzyme (Lipasen). Auf dem Boden einer Agarschale wird eine dünne Schicht Rindertalg gegossen. Auf diese gießt man vorsichtig eine Schicht Agar, ohne das Fett zu schmelzen. Fettspaltende Pilze bewirken, daß der Rindertalg an der Stelle der Kolonie weißer und undurchsichtiger, außerdem feucht und brüchig wird. Nach EIJKMANN beruht die Veränderung auf einer Verseifung des Fettes unter Bildung von Kalk-, Natron- und Ammoniakseifen. Nach Beobachtungen SPIECKERMANNs eignen sich auch Emulsionen von flüssigen Fetten, besonders von Erdnußöl in Agar gut für den Nachweis der Lipasen. Fettspaltende Kolonien umgeben sich infolge der Spaltung der Glyceride in Glycerin und Fettsäuren mit einem Kranz zum Teil schon makroskopisch sichtbarer, weißer Krystalldrusen der Fettsäuren.

Ein auxanographisches Verfahren ist von BELJERINCK auch für Polysaccharide spaltende Enzyme angegeben worden. Er besät Seewasserpeptongelatineplatten mit *Photobacterium phosphorescens* BELJERINCK, bringt auf sie, sobald sie zu dunkeln beginnen, Diffusionsfelder von Saccharose, Lactose und Raffinose und stellt mit den zu prüfenden Pilzarten Impfstriche auf den Diffusionsfeldern her. Überall da, wo die Polysaccharide gespalten werden, leuchten diese Impfstriche nach einiger Zeit auf.

Auch die die Maltose spaltende Maltoglucose weist BELJERINCK mittels Glucosehefen-Auxanogrammes nach. Als solche Hefen verwendet BELJERINCK Kahlhefen (*Mycoderma*), *Saccharomyces apiculatus*, *S. fragans*, *S. kefyi* und *S. tyricola*. Als Nährboden dient 10%ige Gelatine mit 0,5% Monokaliumphosphat, 5% Maltose oder Dextrin oder 0,5% löslicher Stärke, 0,25% Asparagin oder 1% Pepton oder — bei Verwendung von *Mycoderma* — 0,5% Ammoniumchlorid. Die Gelatine wird mit so viel Hefe gemischt, daß sie ganz leicht getrübt ist. Bringt man nun die zu prüfenden Lösungen oder Kulturen auf die Platte, so entwickeln sich die Glucosehefen überall da, wo Maltose bzw. Dextrin bzw. Stärke in Glucose verwandelt wird.

<sup>1</sup> Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1904, 35, 1.

VAN DER LECK<sup>1</sup> gibt folgende Vorschrift für den Nachweis von Lab an: 3%iger Wasseragar wird kurz vor dem Erstarren mit dem gleichen Volumen Milch gemischt und zu Platten ausgegossen. Diese werden bei niedriger Temperatur bis zu dem ursprünglichen Wassergehalt der Milch konzentriert. Labbildende Kolonien erzeugen weiße Diffusionsfelder, die beim Betupfen mit n-Natriumcarbonatlösung unverändert bleiben, während durch Säure gebildete Felder sich auflösen.

Indican und Äsculin spaltende Enzyme lassen sich ebenfalls nach diesem Verfahren nachweisen. Man löst Indican, das man durch Eindampfen eines heißen wäßrigen Extraktes von Indigofera oder Polygonum tinctorium herstellt, in Agar- oder Gelatinenährböden. Das bei der Spaltung des Indicans entstehende Indoxyl färbt sich an der Luft blau. Aus Äsculin entsteht bei der Spaltung Äsculetin, das mit Ferrisalzen braune bis grüne Färbungen gibt. Man erhält nach VAN DER LECK ein brauchbares Äsculinpräparat in folgender Weise: Man zieht Kastanienrinde mit heißem Wasser aus, filtriert, fügt nach dem Erkalten 1% Aluminiumchlorid hinzu, dann Ammoniumcarbonat bis zu stark alkalischer Reaktion, filtriert und dampft bis zur Entfernung des Ammoniaks ein. Von Lösungen, die auf Zusatz von Alkali gut fluorescieren, genügen wenige Kubikzentimeter auf 25 ccm Nährboden. Als Ferrisalz fügt man ein Kryställchen Ferricitrat hinzu. Bei saurer Reaktion entsteht um die spaltenden Kolonien eine grüne, bei alkalischer eine braune Färbung.

Es sei hier bemerkt, daß alle diese auxanographischen Verfahren sich auch zum Nachweis der betreffenden Enzyme in Tier- und Pflanzenorganen und in Präparaten eignen.

Außer diesen auxanographischen Verfahren sind für den Nachweis der Enzyme noch zahlreiche andere vorgeschlagen worden, von denen hier die wichtigsten erwähnt seien.

Für proteolytische Enzyme kommt besonders das von FERMI<sup>2</sup> ausgearbeitete Gelatineverfahren in Betracht, das auch vergleichende Untersuchungen gestattet. Von den verschiedenen Verfahren FERMI'S ist besonders brauchbar das folgende: Je nach der zu wählenden Untersuchungstemperatur löst man 1—10 g Gelatine in 100 ccm Wasser, fügt 0,5 g Phenol, 1—2 g Natriumcarbonat hinzu und macht die Gelatine nach Bedarf neutral oder alkalisch (1—2% Natriumcarbonat) oder sauer (1—5‰ anorganische oder 5—10‰ organische Säure). Die Gelatine wird in Mengen von 1 cm in Röhrrchen gefüllt. Auf dem Röhrrchen wird von der Oberfläche der Gelatine nach unten ein eingeteilter Papierstreifen angebracht. Dann wird auf die Gelatine 0,5—1 ccm der zu untersuchenden Kultur, die mit 5‰ Phenol oder 1‰ Thymol versetzt oder keimfrei filtriert worden ist, gebracht und das Ganze bei 20° gehalten. An der Papierteilung kann man die Geschwindigkeit der Auflösung der Gelatine ablesen. Doch eignet sich dies Verfahren für quantitative Bestimmungen nicht. Ist nur wenig Material vorhanden, so empfiehlt FERMI, die zu untersuchenden Stoffe auf Gelatineplatten zu legen oder zu tupfen.

SCHOUTEN<sup>3</sup> empfiehlt, um die Wirkung geringer Enzymmengen möglichst schnell zu veranschaulichen, die Gelatine mit Zinnober zu vermischen, die Röhrrchen mit der 40° warmen Gelatine 10 Sekunden schräg unter den Wasserleitungsstrahl zu halten und dann aufrecht schnell erstarren zu lassen. Es entsteht auf diese Weise eine sehr dünne rote Gelatineschicht am Glase über

<sup>1</sup> VAN DER LECK: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1907, 17, 366.

<sup>2</sup> FERMI: Arch. Hygiene 1906, 55, 140; Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1906, 16, 176; daselbst auch die ältere Literatur.

<sup>3</sup> SCHOUTEN: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1907, 18, 94.

der Hauptmenge der Gelatine, deren Verflüssigung schneller eintritt und leicht zu beobachten ist. Im übrigen ist die Anordnung dieselbe wie die FERMIS.

ABDERHALDEN und STEINBECK<sup>1</sup> verwenden zum Nachweis peptolytischer Enzyme Seidenpepton. Dieses scheidet unter dem Einfluß der hydrolytischen Spaltung Tyrosin ab, das sich dann auf der Oberfläche der Organismen absetzt.

Labenzyme, die häufig gleichzeitig mit proteolytischen auftreten, sind überall da zu vermuten, wo Milch bei amphoterer oder alkalischer Reaktion koaguliert wird. Doch sind auch Bakterien bekannt, die die Milch durch gleichzeitige Säure- und Labbildung koagulieren. Man kann diese Enzyme außer in der auf S. 1610 beschriebenen Weise gegebenenfalls auch noch so nachweisen, daß man bei 55—60° vorsichtig sterilisierte Kulturen mit sterilisierter Milch mischt.

Für Diastasen eignet sich dünner Stärkekleister, der mit der zu prüfenden Kultur und mit Phenol oder Thymol vermischt und zeitweilig mit FEHLINGScher Lösung auf das Auftreten reduzierender Zucker geprüft wird. Den Nachweis der die Polysaccharide spaltenden Enzyme erbringt man in ähnlicher Weise. Bei Hefen verfährt man in der Weise, daß man die Zellen mittels eines PUKALLschen Filters filtriert, mit kaltem sterilisiertem Wasser gründlich bis zum Verschwinden der Reaktion mit FEHLINGScher Lösung wäscht und dann frisch oder nach mehrtägigem Trocknen auf Tontellern verarbeitet. Man mischt die Hefe mit dem betreffenden Zucker, Wasser und etwas Toluol (um die Gärung zu unterdrücken) und bewahrt die Mischung im zugeschmolzenen Reagensglase bei 24—25° auf. Nähere Angaben findet man bei LINDNER.

Zum Nachweis eines harnstoffspaltenden Enzyms (Urease) kultiviert man nach VICHÖVER<sup>2</sup> die Mikroorganismen auf Nährböden, denen 0,1% Ammoniumcarbonat und 2—5% Harnstoff zugesetzt sind, bei etwa 30° C. Die Kolonien zeigen dann mitunter schon nach 24 Stunden einen Hof von in Wasser unlöslichen Krystallen (Calciumcarbonat und -phosphat), die durch das freiwerdende Ammoniak abgeschieden wurden.

Über Pektasen, Enzyme, die die pektinreiche Mittellamelle in Pflanzengewebe lösen, vergleiche z. B. JONES<sup>3</sup> und SPIECKERMANN<sup>4</sup>. Ihr Nachweis geschieht durch Kultur der Organismen auf rohen Kartoffeln oder Rüben. Die Zellen fallen hierbei auseinander.

Cellulose lösende Enzyme weist man nach VAN JTERSON<sup>5</sup> durch Kultur auf Filtrierpapier nach. Über Enzyme thermophiler Bakterien, die Cellulose und Hemicellulosen abbauen, vgl. H. PRINGSHEIM<sup>6</sup>.

GRÜSS<sup>7</sup> hat in der Hefe eine Oxydase mittels Tetramethylparaphenyldiaminchlorid nachgewiesen. Tränkt man ein Filtrierpapier mit einer sehr verdünnten Lösung dieses Salzes und bringt etwas gepreßte, gelagerte Hefe auf das Papier, so entsteht um die Hefe herum ein violetter Rand. Frische Hefe ragiert nicht. Die Oxydase wirkt nicht auf Guajak, wohl aber auf fuchsinschweflige Säure und reduziertes Methylenblau und oxydiert Aldehyd zu Essigsäure.

Für den Nachweis von Oxydasen bei Bakterien verwenden SCHULTZE und KRAMER<sup>8</sup> einen Nährboden aus 3 Teilen flüssigem Agar und 1 Teil eines Gemisches aus einer 1%igen alkalischen Lösung von  $\alpha$ -Naphthol und einer

<sup>1</sup> ABDERHALDEN u. STEINBECK: Zeitschr. physiol. Chem. 1910, 68, 312.

<sup>2</sup> VICHÖVER: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1913/14, 39, 209.

<sup>3</sup> JONES: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1905, 14, 257.

<sup>4</sup> SPIECKERMANN: Landw. Jahrb. 1902, 31, 155.

<sup>5</sup> VAN JTERSON: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1904, 11, 689.

<sup>6</sup> H. PRINGSHEIM: Zeitschr. physiol. Chem. 1912, 78, 266; 80, 376.

<sup>7</sup> GRÜSS: Nach LINDNER: Mikroskopische Betriebskontrolle, 6. Aufl. S. 229.

<sup>8</sup> SCHULTZE u. KRAMER: Zentralbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., 1911, 56, 544; 1912, 62, 394.

1—2%igen Lösung von Dimethylparaphenylendiaminchlorhydrat (2 Teile der letzteren sind mit 1 Teil der Naphthollösung zu mischen). Oxydierende Mikroorganismen färben den Agar nach kurzer Zeit dunkelblau.

Zum Nachweis von Reduktionsvorgängen dienen Lackmus, Methylblau, Indigo, die in Bouillon- oder Agarkulturen angewendet werden. SCHULTZE und KRAMER benutzen einen Agar, der p-Nitrosodimethylanilin und  $\alpha$ -Naphthol enthält und durch reduzierend wirkende Organismen sofort grün gefärbt wird.

Das Wasserstoffsperoxyd zersetzende Enzym Katalase ist nach JORNS<sup>1</sup> bei Bakterien allgemein in Form eines Endo- und Ektoenzym verbreitet. Es wird durch Zusatz von 1%igem Wasserstoffsperoxyd zu Bouillonkulturen nachgewiesen. Quantitativ kann es durch Titration mit Kaliumpermanganat festgestellt werden. In der Hefe ist anscheinend nur Endokatalase vorhanden.

### 3. Stoffwechselprodukte.

Bei der Untersuchung der durch die chemische Tätigkeit der Pilze entstandenen Zersetzungsprodukte wird nur in den selteneren Fällen eine vollständige Feststellung des gesamten Stoffumsatzes angestrebt. Meist beschränkt man sich entsprechend den jeweiligen Zwecken auf die Untersuchung des Verhaltens der Organismen gegen einige der wichtigsten Gruppen der organischen Stoffe, besonders der Kohlenhydrate und Eiweißstoffe und wählt auch hier nur einige besonders eigenartige Erscheinungen aus. Ein bestimmtes Schema läßt sich hier nicht geben; man muß vielmehr von Fall zu Fall entscheiden, nach welcher Richtung die Untersuchungen etwa auszudehnen sind.

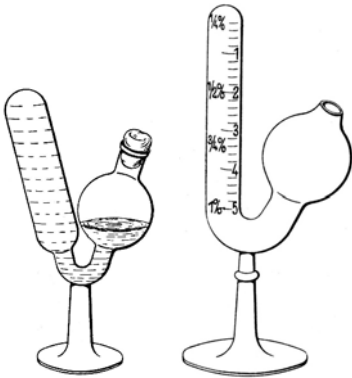


Abb. 58. Gärkölbchen nach EINHORN.

Eine allgemeine Folge der verschiedenen in einer Pilzkultur verlaufenden chemischen Vorgänge ist eine Veränderung der Reaktion. ARTH. MEYER hat daher für die Artkennzeichnung von Bakterien die Bestimmung von Acidität und Alkalität der Kulturen in verschiedenen Nährflüssigkeiten vorgeschlagen.

Einen tieferen Einblick in die chemischen Vorgänge in den Kulturen gibt eine solche Bestimmung allerdings nicht; denn die Reaktion ist nur die Summe verschiedener gleichzeitig in verschiedener Richtung verlaufender Vorgänge. Es wird sich daher stets empfehlen, durch einige einfache und bequem auszuführende Versuche das Verhalten der Pilze wenigstens gegen die wichtigsten organischen Stoffe kennen zu lernen.

a) **Vergärung von Kohlenhydraten.** Zuckerarten werden von zahlreichen Pilzen vergoren, teils zu organischen Säuren, teils außerdem zu Kohlensäure und Wasserstoff. Die Vergärung der Kohlenhydrate zu Gasen läßt sich leicht mittels der Gärkölbchen nach EINHORN (Abb. 58) nachweisen, in deren geschlossenem Schenkel sich die Gärungsgase ansammeln. Eine annähernde Analyse der Gase läßt sich in der Weise bewerkstelligen, daß man nach Vermerken des Gasstandes das Kölbchen mit starker Kalilauge füllt, es mit dem Daumen verschließt, umschüttelt und vorsichtig öffnet. Die Verminderung des Gasvolumens ist auf Kohlensäure zurückzuführen; der Rest ist Wasser-

<sup>1</sup> JORNS: Arch. Hygiene 1908, 67, 134.

stoff, Stickstoff, Methan. Füllt man das Kölbchen wieder mit Wasser, schließt mit dem Daumen, läßt das Gas in den offenen Schenkel treten und nähert die Mündung einer Flamme, so verpufft der Gasrest. Gärkölbchen, die eine genauere Analyse der Gase gestatten, hat ARTH. MEYER (Abb. 59) angegeben. Das Gärkölbchen dient in diesem Falle gleichzeitig als Gasbürette, in der mittels der Platindrähte bei *E* auch die mit Sauerstoff verbrennenden Gase bestimmt werden können.

Noch schneller als im Gärkölbchen läßt sich der Nachweis des Vermögens zur Gasgärung in Stich- oder Schüttelkulturen von Bakterien in Glucoseagar führen. Die Schüttelkulturen erhält man, indem man in der üblichen Weise geimpfte flüssige Agarröhrchen schnell aufrecht erstarren läßt. Die sich in den Stich- oder Schüttelkulturen entwickelnden gaserzeugenden Bakterien bewirken das Entstehen zahlreicher kleiner Glasblasen, die später zu größeren Gasvakuolen zusammen-treten, den Agar zerreißen und unter Umständen sogar aus dem Röhrchen heraustreiben (Abb. 60). Dieses Verfahren eignet sich nicht nur zum schnellen Nachweise des Gärvermögens, sondern es kann nach BURRI und DÜGGEL<sup>1</sup> auch zur quantitativen Bestimmung und Untersuchung der Gärungs-gase benutzt werden. Man füllt in eine 15 mm weite, 40 bis 50 cm lange, starkwandige, an einem Ende zugeschmolzene, sterilisierte Röhre 10 ccm des auf 42° gekühlten, mit der betreffenden Bakterienart geimpften und gut durchmischten Agars, nachdem die Röhre vorher auf 45° vorgewärmt worden war. Sodann läßt man durch Einstellen in kaltes Wasser erstarren, füllt in die Röhre hierauf noch etwa 3—4 ccm 60—80° warmen Wasseragar und läßt auch diesen rasch erstarren. Die Höhe der gesamten Agarschicht wird an der Röhre vermerkt und diese nun bei der gewünschten

Temperatur horizontal aufbewahrt. Entsprechend der Gasentwicklung verschiebt sich der Wasseragarpfropf nach der Röhrenmündung, und man kann die erzeugte Gasmenge an den beiden Marken bei Anwendung kalibrierter Röhren direkt, sonst nachträglich durch Ausmessen feststellen. Will man die Gase auf den Gehalt an Wasserstoff und Kohlen-dioxyd untersuchen, so füllt man die Röhre über dem Agar mit Wasser, stellt sie umgekehrt in ein Gefäß mit lauwarmem Wasser und zerstört mittels hakig gebogenen Drahtes den Agar, um die Gasblasen zu befreien. Das Gas steigt nach oben, der gasfreie Agar sinkt ins Wasser. Schiebt man nun ein 2—3 cm langes Stück Kaliumhydroxyd in die Röhre (Gummifinger), verschließt sie sofort mit einem Gummistopfen, schüttelt sie und öffnet nach einiger Zeit unter Wasser, so ist der rückständige Gasrest Wasserstoff (ein etwaiger Stickstoff- oder Methangehalt wird vernachlässigt).

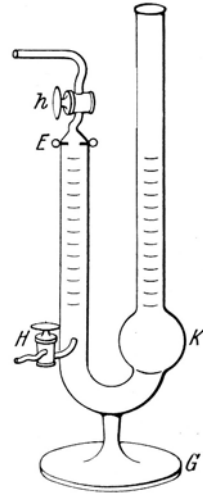


Abb. 59.  
Gärkölbchen  
nach A. MEYER.

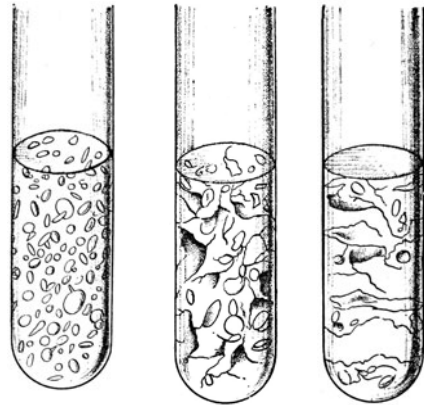


Abb. 60. Schüttelkulturen von *Bacterium coli*  
in Glucoseagar nach 12, 24, 48 Stunden.

<sup>1</sup> BURRI u. DÜGGEL: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt. Orig., 1909, 49, 155.

Ein Verfahren, das sich sehr gut zu orientierenden Versuchen über das Gärvermögen der Hefen und anderer höherer Pilze eignet, ist die von LINDNER angegebene „Kleingärmethode“ im hohlen Objektträger (Abb. 61). Man bringt in die Höhlung des in der Flamme sterilisierten Objektträgers eine Aufschwemmung der betreffenden Hefe in sterilisiertem Leitungswasser, gibt dann eine kleine Menge des zu prüfenden Zuckers hinzu, legt ein sterilisiertes

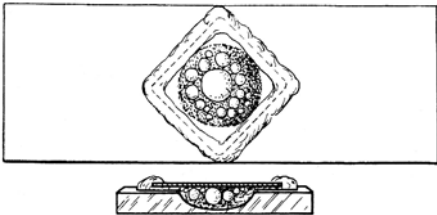


Abb. 61. Gärversuch im hohlen Objektträger.  
(Nach LINDNER.)

Deckglas auf und schließt luftdicht mit sterilisierter Vaseline ab. Wichtig ist, daß man die Menge des Hefenwassers richtig wählt. Es darf, wenn das Deckgläschen über die Flüssigkeit geschoben wird, keine Luftblase darunter verbleiben; andererseits darf die Flüssigkeit auch nicht zu stark unter dem Deckglas hervorquellen. Die Kulturen werden bei 25° gehalten. Schon nach 12—24 Stunden ist in den gärenden

Proben eine starke Gasentwicklung zu bemerken. In zweifelhaften Fällen erwärmt man den Objektträger in der Mitte schwach mit einer Sparflamme. Ist auch nur schwache Gärung vorhanden, so zeigen sich sofort zahlreiche kleine Kohlensäurebläschen.

Vor jedem Kleingärungsversuch muß jedoch geprüft werden, ob die Hefe mit Jodlösung eine rotbraune Färbung zeigt, also Glykogen enthält. Zutreffendfalls läßt man die Hefe in sterilem Wasser so lange stehen, bis das Glykogen verschwunden ist.



Abb. 62.  
FREUDENREICH-  
Kolben.

Für ein eingehenderes Studium der Gärung der Hefen ist aber die genaue Beobachtung ihres Verhaltens in größeren Mengen der Zuckerlösungen nötig. Man verwendet dazu ERLÉNMEYER-Kolben oder Gärkolben nach FREUDENREICH oder HANSEN, die durch einen mittels Schliff dicht schließenden Helm verschlossen sind (Abb. 62 und 63). Die Impfung dieser Kolben erfolgt entweder nach Abnahme des Helmes durch die Halsöffnung oder durch die Öffnung des seitlichen Stützens.

Nach den äußeren Erscheinungen unterscheidet man obergärige und untergärige Hefen. Auf Kulturen obergäriger Hefen bildet sich ein milchiger Schaum, weil mit den Gasblasen und eiweißartigen Ausscheidungen zahlreiche Hefezellen an die Oberfläche geführt werden, wodurch eine die Schaumbläschen überziehende dichte Schicht entsteht, die in Form eines Ringes an die Gefäßwandung gepreßt wird. Der Schaum untergäriger Kulturen enthält nur wenige Hefezellen. Die Hauptmenge der Hefe sammelt sich am Boden an. Doch ist zu berücksichtigen, daß nach neueren Erfahrungen Ober- und Untergärung keine unveränderlichen Eigenschaften der Arten sind.

Zu beachten ist bei Hefen ferner, ob die gärenden Flüssigkeiten sich schnell („Bruchhefen“) oder langsam („Staubhefen“) klären. Die Art des Absetzens, die Beschaffenheit der Oberfläche des Bodensatzes, Geschmack, Geruch und Farbe der Flüssigkeit sind zu beachten.

Wichtig für die Kennzeichnung einer Art ist der Vergärungsgrad, d. h. die Feststellung, wieweit eine Hefe imstande ist, eine Würze zu vergären. Man läßt hierbei größere Mengen Zuckerlösung vergären, bestimmt den täglichen Gewichtsverlust und nach dem Beständigwerden des Gewichtes die Menge des erzeugten Alkohols.

Bei Gärversuchen mit Fadenmycelpilzen ist zu beachten, ob eine Sproßmycelgeneration auftritt, ob die Alkoholzerzeugung bei Luftabschluß und -zutritt vor sich geht.

Die Bildung organischer Säuren aus Zuckern läßt sich oft durch das Plattenkulturverfahren nachweisen. Auf Platten von Agar, dem im flüssigen Zustande so viel feingepulvertes, trocken sterilisiertes Calciumcarbonat zugesetzt wird, daß die Mischung trüb und undurchsichtig erscheint, entsteht um säurebildende Kolonien herum infolge der Auflösung des Kalkes ein hellerer Hof. Durch Verwendung von Zinkcarbonat können Milchsäurebakterien ausgeschlossen und andere Säuren nachgewiesen werden. Ebenso eignen sich zum Nachweis der Säurebildung mit Lackmuslösung nach KUBEL-TIEMANN violett gefärbte Platten. Säurebildung aus Lactose läßt sich in Milchkulturen durch Koagulation des Caseins bequem nachweisen. Ob ein Mikroorganismus Oxysäuren produziert, läßt sich nach SÖHNGEN<sup>1</sup> bei Ernährung mit Manganoxyd feststellen, das dem glucosehaltigen Nährboden bis zur Schwarzfärbung zugesetzt wird. Oxysäuren reduzieren das Manganoxyd, wobei sich um die betreffenden Kolonien ein heller Hof bildet.

Für den Nachweis der verschiedenen Gärungssäuren kommen die bekannten chemischen Verfahren in Betracht. Die Menge der Säure wird durch Titration ermittelt unter Berücksichtigung des Ausgangsnährbodens.

Zu beachten ist in zuckerhaltigen Nährböden weiter die etwaige Bildung von Schleimen sowie Fruchtestern.

Auch die Zersetzung höherer Alkohole (Glycerin, Mannit, Duleit), von Cellulose und anderen komplizierteren Kohlenhydraten, ferner von organischen Säuren und ihren Salzen ist gegebenenfalls zur Kennzeichnung eines Pilzes heranzuziehen.

**b) Zersetzung von stickstoffhaltigen Körpern.** Die Umsetzung der stickstoffhaltigen organischen und anorganischen Verbindungen durch die Pilze ergibt vielfach leicht festzustellende, für die Differentialdiagnose wertvolle Abbauerzeugnisse.

Salpetersäure wird in ihren Salzen durch zahlreiche Pilze zu salpetriger Säure bzw. zu Ammoniak reduziert, die durch die bekannten Farbenreaktionen nachweisbar sind. Gewisse Bakterienarten zerstören bei Gegenwart organischer Stoffe salpetersaure Salze unter Entbindung von Stickstoff (denitrifizierende Bakterien). Diesen Vorgang kann man nach Art der Zuckergärung im EINHORNSchen Kolben oder in Agarstich- oder Schüttelkulturen verfolgen.

In Kulturen, die Pepton oder Eiweiß enthalten, erzeugen manche Bakterienarten Indol, das in Form von Nitrosoindol nachgewiesen werden kann. Sind in den Kulturen gleichzeitig Spuren von Nitrit vorhanden, so genügt der Zusatz von einigen Tropfen 10%iger Schwefelsäure, um eine Rotfärbung hervorzurufen. Meist ist es nötig, noch etwa 0,5—2 ccm einer 1/2%igen Natriumnitritlösung hinzuzufügen. Erheblich schärfer ist die EHRLICHsche<sup>2</sup> Reaktion. Hierzu sind zwei Lösungen erforderlich, nämlich:

1. p-Dimethylamidobenzaldehyd 4 g, 96%iger Alkohol 380 g, konzentrierte Salzsäure 80 g.
2. Gesättigte Kaliumpersulfatlösung.

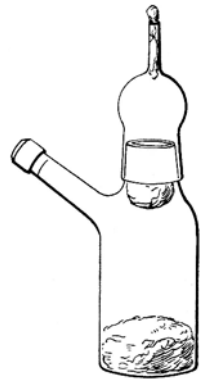


Abb. 63.  
HANSEN-Kolben.

<sup>1</sup> SÖHNGEN: Zentralbl. Bakteriolog. II. Abt., 1914, 40, 545.

<sup>2</sup> EHRLICH: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt. Orig., 1906, 40, 130.



Etwa 10 ccm der eintägigen Bakterienkultur in Nährbouillon werden mit 5 ccm von Lösung 1 und dann mit 5 ccm von Lösung 2 versetzt. Bei Gegenwart von Indol tritt Rotfärbung auf. Der Farbstoff läßt sich durch Schütteln mit Amylalkohol ausziehen. Das Maximum der Indolbildung ist nach DE GRAAF in 3 Wochen erreicht.

Die bei dem Abbau des Proteinmoleküls auftretenden stickstoffhaltigen und stickstofffreien Stoffe werden nach den üblichen Verfahren getrennt und bestimmt.

Schwefelwasserstoff wird von sehr vielen Bakterien in peptonhaltigen Nährböden gebildet, von einigen auch aus Thiosulfat und Sulfid, von *Spirillum desulfuricans* und anderen Anaerobiern sogar aus Sulfaten. Der Nachweis erfolgt mittels Bleipapiers. Auf Platten aus Nähragar, der mit kohlenausem Blei versetzt worden ist, zeigen Schwefelwasserstoff bildende Kolonien einen schwarzen Hof. Auch Gelatine, die mit einer durch Natriumcarbonat alkalisch gemachten Lösung von Ferrum tartaric. oxydat. (MERCK) (0,5 g in 50 ccm Wasser) versetzt worden ist, gibt eine derartige Reaktion.

Harnstoff wird von vielen Bakterienarten in Ammoniak und Kohlensäure zerlegt (vgl. S. 1611), doch ist auch diese, wie so viele biologische Eigenschaften, variabel.

#### 4. Kardinalpunkte der Temperaturen für Keimung, vegetatives Wachstum und Sporenbildung.

Die Temperatur hat einen großen Einfluß auf die Keimung der Sporen, auf das Wachstum der vegetativen Formen und die Bildung der Sporen. Da dieser Einfluß konstant ist, so kann er als differential-diagnostisches Merkmal verwendet werden. Besondere Bedeutung haben die Kardinalpunkte, d. h. die Maximum-, Optimum- und Minimumtemperaturen.

Diese Kardinalpunkte sind für viele Pilze mehr oder minder genau bestimmt worden. Für alle diese Angaben muß aber bemerkt werden, daß sie nur für die Verhältnisse gelten, unter denen sie gewonnen wurden. Vergleichende Versuche müssen unter absolut gleichen Verhältnissen, was Nährboden, Luft-, Lichtzutritt, physiologischen Zustand des Sporenmateriale betrifft, ausgeführt werden. Eine Zusammenstellung zahlreicher Kardinalpunkte, die für eine schnelle Orientierung brauchbar ist, bringt ARTH. MEYER in seinem bakteriologischen Praktikum. Er empfiehlt für die Bestimmung der Kardinalpunkte der Bakteriensporenceimung Abkochen des Sporenmateriale eine bestimmte Zeit lang, Impfung auf ein chemisch genau definiertes, der Art gut zusagendes Nährmaterial, das sich in bestimmter Menge in Gläsern bestimmter Weite befindet. An denselben Kulturen kann auch annähernd der Beginn und Verlauf der Sporenbildung festgestellt werden.

Besonders eingehend sind die Kardinalpunkte für die Sporenbildung, Sproßbildung und Hautbildung der Hefen von HANSEN untersucht worden. HANSEN hat den Satz aufgestellt, daß die Maximaltemperatur für die Sporenbildung der *Saccharomyceten* immer einige Grade niedriger und die Minimaltemperatur einige Grade höher als für die Sproßbildung liegt.

Die genaue Bestimmung der Kardinalpunkte der Temperaturen für eine Spezies ist eine mühevoll und zeitraubende Arbeit. Ohne einen PANUMSchen Thermostat ist sie kaum durchführbar. Da dieser nicht überall vorhanden ist, so wird man sich bei vergleichenden Untersuchungen in der Regel darauf beschränken müssen, bei einer oder einigen wenigen Temperaturen die Zeiten für Sporenceimung, optimales vegetatives Wachstum und Sporenbildung festzulegen.

### 5. Tötungszeiten für Sporen und vegetative Formen bei verschiedenen Temperaturen.

Brauchbare Merkmale für die Artendiagnose geben auch die Tötungszeiten ab. Doch sind hierbei je nach der Herkunft des untersuchten Materials starke Schwankungen beobachtet worden, und man wird auch hier nur Material vergleichen dürfen, das längere Zeit unter gleichen Lebensbedingungen gestanden hat. Für Bakteriensporen empfiehlt ARTH. MEYER folgendes Verfahren: Sterile Reagensgläser von 8—9 cm Länge und 8—9 mm innerer Weite werden 1 cm hoch mit sterilem Wasser gefüllt, mit dem betreffenden Sporenmateriale geimpft und in die 9 mm weiten kreisrunden Löcher einer 1 cm dicken kreisförmigen Korkplatte von 8 cm Durchmesser gesteckt. Für Untersuchungen bei 100° benutzt man ein siedendes Wasserbad, in das man die Korkplatte mit den Röhrchen bringt. Von Zeit zu Zeit entfernt man eines der Röhrchen aus dem Wasserbade, taucht es sofort in kaltes Wasser und erhitzt dann die Teile über dem Wasser, um alle etwa obensitzenden Sporen abzutöten. Man entfernt dann den Wattebausch, brennt den Rand des Röhrchens ab, gießt den ganzen Inhalt auf die Oberfläche eines Agarröhrchens aus und läßt dieses bei 28° einige Tage stehen, um die Entwicklung der überlebenden Sporen zu beobachten.

Für Versuche bei tieferen Temperaturen benutzt ARTH. MEYER einen Thermostaten, der nach dem Prinzip des Trockenapparates von VICTOR MEYER eingerichtet ist. Der Raum zwischen den doppelten Wandungen wird mit einer Flüssigkeit von entsprechendem Siedepunkt gefüllt.

Der Arbeitsraum des Apparates wird bis etwa 9 cm unterhalb des Randes mit Wasser gefüllt. Man beobachtet nach Ingangsetzen des Apparates die Temperatur im Wasser und stellt, nachdem Konstanz eingetreten ist, die Korkscheibe mit den Versuchsröhrchen hinein. Der Untersuchungsgang ist derselbe, wie oben angegeben.

Man wird diesen Apparat auch für die Prüfung der Sporen höherer Pilze, sowie ihrer vegetativen Formen gebrauchen können und, wenn man das Wasser fortläßt, auch für die Untersuchung des Einflusses der trockenen Wärme.

Für Hefenuntersuchungen bringt LINDNER in seinem Lehrbuche einige kurze Angaben.

### 6. Anhang: Bakteriophagie.

Das Phänomen der Bakteriophagie ist zuerst von D'HERELLE an keimfreien Filtraten beobachtet worden, die aus dem Darminhalt ruhrkranker Personen hergestellt worden waren. Wurde das Filtrat einer Kultur von Ruhrbakterien zugesetzt, so erfolgte Auflösung der Bakterien, die nach Ansicht D'HERELLES durch ein ultramikroskopisches Lebewesen, einen Parasiten der Bakterien, herbeigeführt wird. Trotz zahlreicher Untersuchungen, die sich mit der Natur des Bakteriophagen beschäftigen, ist die Frage immer noch nicht geklärt, ob die Auflösung (Lysis) eine Funktion eines besonderen von dem betreffenden Bacterium produzierten Lysins ist oder die eines lebenden Organismus, nämlich des betreffenden Phagen.

Bakteriophagen werden z. B. überall dort im Wasser angetroffen, wo Abwässer oder fäkale Verunreinigungen hineingelangen. Die bisher im Wasser nachgewiesenen Bakteriophagen waren in erster Linie solche gegen die Ruhrgruppe aber auch gegen Bakterien der Typhus-Paratyphus-Coligruppe<sup>1</sup>.

Mitteilungen über das häufige Vorkommen von Phagen in oder auf Lebensmitteln, wie Brunnenwasser, Kuhmilch (Dysenteriephagen), Käse (Proteusphagen), Fleischwaren (Dysenterie- und Proteusphagen) machte C. SONNENSCHNEIN<sup>2</sup>.

In Flüssigkeiten vorkommende Bakteriophagen isoliert man im allgemeinen einfach durch Filtrieren der zu untersuchenden Flüssigkeit durch ein bakterienndichtes Filter.

<sup>1</sup> GILDEMEISTER u. WATANABE: Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig. 1931, 122, 556.

<sup>2</sup> SONNENSCHNEIN: Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig. 1932, 126, 297.

Will man aus Wasser, Erde usw. Bakteriophagen gegen bestimmte Bakterienarten zu isolieren versuchen, so impft man nach NYBERG<sup>1</sup> die betreffenden Bakterien zusammen mit dem Material, in dem der Bakteriophage gesucht wird, in Bouillon. Nach 24stündiger Bebrütung werden die vorkommenden durch die Kultur verstärkten Bakteriophagen durch Filtrieren der Flüssigkeit durch ein bakteriedichtes Filter rein erhalten.

Für die Lebensmitteluntersuchung besitzt die ganze Frage bisher noch keine praktische Bedeutung.

## VII. Systematik der Pilze und Beschreibung der auf Lebensmitteln allgemein verbreiteten Arten.

Die Systematik der Pilze kann hier nur soweit berücksichtigt werden, daß sie den Lebensmittelchemiker in den Stand setzt, sich über die Stellung einer Art im System zu unterrichten. Eine eingehendere Beschreibung ist in diesem Teile des Werkes nur für die allgemeiner auf Lebensmitteln verbreiteten Arten — mit Ausnahme der Bakterien — beabsichtigt. Solche, die an besondere Lebensmittel gebunden sind, werden später bei diesen berücksichtigt werden. Für die meisten Fälle der Praxis dürften die nachstehenden Angaben ausreichen. Für eingehenderes Studium kommen die S. 1556 aufgeführten Spezialwerke in Betracht.

Dem herrschenden Gebrauche entsprechend rechnen wir hier zu den Pilzen die drei großen Gruppen der Myxomyceten, der Schizomyceten (Bakterien) und der Eumyceten. Auf die Frage nach der Verwandtschaft dieser Gruppen kann hier nicht näher eingegangen werden.

Auch die Systematik der Myxomyceten soll hier unerörtert bleiben, da von ihnen für die Zwecke dieses Werkes zur Zeit nur eine parasitisch lebende Art: *Plasmodiophora brassicae* WOR., der Erreger der Kohlhernie, von Interesse ist.

### A. Bakterien.

Für die Einteilung der Bakterien sind von den verschiedenen Autoren neben den Zellformen die Zellteilung, die Fruktifikation und die physiologischen Eigenschaften als Grundlagen verwendet worden. Nicht zweckmäßig sind die sich lediglich auf physiologischen Eigenschaften aufbauenden Systeme, weil sie notwendigerweise zur Zerreißen der natürlichen Gruppen führen. Die die morphologischen Merkmale verwertenden Systeme stimmen in der Familiengliederung im wesentlichen überein, dagegen bestehen in der Bewertung der obengenannten Merkmale für die Unterscheidung der Gattungen unter den Autoren wesentliche Unterschiede.

Die Systematik der Spaltpilze bietet hauptsächlich deswegen außerordentliche Schwierigkeiten, weil infolge der Kleinheit der Formen diagnostisch verwertbare morphologische und cytologische Merkmale überhaupt schwer wahrnehmbar sind. Hinzu kommt noch, daß die äußere Gestalt bei vielen Arten einer starken Variabilität unterliegt, was auch für die Geißelproduktion und die damit zusammenhängende Eigenbewegung, ja sogar für die Sporenbildung und selbst für biologische Merkmale gilt.

Unabhängig von dieser längst bekannten Variabilität der Formen und biologischen Eigenschaften zeigen zudem die Untersuchungen von LÖHNIS<sup>2</sup>, daß man einen regelmäßigen Wechsel in der Erscheinungsform findet, wenn man die Bakterien längere Zeit hindurch unter wechselnden Lebensbedingungen beobachtet. Es liegt hier nach LÖHNIS eine durch die verschiedenen Stufen der Entwicklung bedingte Mehrgestaltigkeit (Pleomorphismus)

<sup>1</sup> HYBERG: Zentralbl. Bakteriolog. I. Abt. Orig. 1931, 122, 270.

<sup>2</sup> LÖHNIS: Zentralbl. Bakteriolog. II. Abt. 1922, 56, 529.

vor. Neuerdings versucht ENDERLEIN<sup>1</sup> unter Zugrundelegung einer vergleichenden Bakterienmorphologie bzw. -cytologie den Entwicklungskreislauf (Cyclogenie) der Bakterien aufzuklären und auf dieser Basis ein System zu begründen. Die vorläufig noch bestrittenen neuen Befunde ENDERLEIN'S und seiner Mitarbeiter sind übrigens deswegen revolutionierend, weil sie die Entstehung bestimmter pathogener Bakterien aus Schimmelpilzsporen annehmen.

Von den bisherigen Bakteriensystemen hat sich deshalb kein einziges allgemeine Anerkennung zu erringen vermocht. Trotz ihrer Mängel verdienen jedoch von den durch Botaniker aufgestellten Systemen immer noch die von A. FISCHER und W. MIGULA Beachtung, während von den durch Mediziner ausgebildeten Systemen das von K. B. LEHMANN und R. O. NEUMANN besonders hervorgehoben werden soll, weil danach ein für den Praktiker sehr brauchbarer Leitfaden zur Bestimmung der Arten aufgebaut ist.

Im folgenden wird eine kurze Übersicht über diese drei Systeme gegeben, weil ihre Kenntnis für das Verständnis der in der Literatur vorkommenden Bezeichnungen nicht ganz zu umgehen ist.

## 1. System von ALFRED FISCHER.

### 1. Ordnung: Haplobacterinae.

Vegetationskörper einzellig, kugelig, zylindrisch oder schraubig, einzeln oder zu unverzweigten Ketten und anderen Wuchsformen vereinigt.

I. Familie: *Coccaceae*. Vegetationskörper kugelig.

1. Unterfamilie: *Allococcaceae*<sup>2</sup>. Mit beliebig in den drei Richtungen des Raumes wechselnder Teilungsfolge. Keine scharf ausgeprägten Wuchsformen, bald kurze Ketten, bald traubige Häufchen, bald paarweise, bald einzeln.

1. Gattung: *Micrococcus* COHN. Unbeweglich.

2. Gattung: *Planococcus* MIGULA. Beweglich.

2. Unterfamilie: *Homococcaceae*. Mit bestimmter für jede Gattung typischer Teilungsfolge.

3. Gattung: *Sarcina* GOODSIR. Teilungswände folgen sich in den drei Richtungen des Raumes, es entstehen paketartige Wuchsformen, daneben Einzelkokken, Tetrakokken, aber keine Ketten; unbeweglich.

4. Gattung: *Planosarcina* MIGULA, wie die vorige, aber beweglich, monotrich begeißelt.

5. Gattung: *Pediococcus* LINDNER. Teilungswände kreuzweise in den beiden Richtungen der Ebene abwechselnd, Zellen zu vier, oder zu Täfelchen zusammengelagert oder einzeln, keine Ketten bildend.

6. Gattung: *Streptococcus* (BILLROTH). Teilungswände immer parallel, nur in derselben Richtung; Wuchs in Ketten, Pärchen und einzeln, keine Täfelchen, keine Pakete.

II. Familie: *Bacillaceae*. Vegetationskörper zylindrisch, ellipsoidisch, eiförmig, gerade, bei den kurzen fast kugeligen Formen wird die Trennung von Kokken schwer. Teilung immer senkrecht zur Längsachse, als Wuchsform nur unverzweigte Ketten.

1. Unterfamilie: *Bacilleae*. Sporenbildende Stäbchen unverändert; zylindrisch.

7. Gattung: *Bacillus* (COHN). Unbeweglich.

8. Gattung: *Bacterium* A. FISCHER. Beweglich, monotrich mit einer polaren Geißel.

9. Gattung: *Bacirillum* A. FISCHER. Mit lophotrichen Geißeln.

10. Gattung: *Bactridium* A. FISCHER. Beweglich, peritrich begeißelt.

2. Unterfamilie: *Clostridieae*. Sporenbildende Stäbchen spindelförmig.

11. Gattung: *Paracloster* A. FISCHER. Unbeweglich.

12. Gattung: *Clostridium* PRAZMOWSKI. Beweglich, peritrich begeißelt.

3. Unterfamilie: *Plectridieae*.

13. Gattung: *Paraplectrum* A. FISCHER. Unbeweglich.

14. Gattung: *Plectridium* A. FISCHER. Beweglich, peritrich begeißelt.

III. Familie: *Spirillaceae*, Schraubenbakterien. Vegetationskörper zylindrisch, aber schraubig gekrümmt, Teilung immer senkrecht zur Längsachse.

<sup>1</sup> G. ENDERLEIN: Bakterien-Cyklogenie. Berlin u. Leipzig 1925.

<sup>2</sup> MIGULA hat einen beliebigen Wechsel der Teilungsfolge der Coccaceen nie beobachtet.

15. Gattung: *Vibrio* (MÜLLER-LÖFFLER), schwach kommaförmig gekrümmt, beweglich, monotrich begeißelt.
16. Gattung: *Spirillum* (EHRENBERG), stärker schraubig in weiten Windungen gekrümmt, beweglich, lophotrich begeißelt.
17. Gattung: *Spirochaete* (EHRENBERG), sehr enge, zahlreiche Schraubenwindungen, Geißeln unbekannt, Zellwand vielleicht flexil.

## 2. Ordnung: *Trichobacterinae*.

Vegetationskörper ein unverzweigter oder verzweigter Zellfaden, dessen Glieder als Schwärmzellen (Gonidien) oder als Hormogonien sich ablösen.

### IV. Familie: *Trichobacteriaceae*, Fadenbakterien. Charakter der der Ordnung.

- a) Fäden unbeweglich, starr in eine Scheide eingeschlossen.
  - aa) Unverzweigt:
    18. Gattung: *Chlamydothrix* MIGULA. Nicht festgewachsen, schwärmende Zylindergonidien.
    19. Gattung: *Thiothrix* WINOGRADSKI, wie vorige, aber mit Schwefel und festgewachsen.
    20. Gattung: *Crenothrix* COHN. Festgewachsen, ohne Schwefel, mit Kugelgonidien, deren Bewegung noch nicht beobachtet wurde.
    - bb) Gabelig pseudoverzweigt:
      21. Gattung: *Cladothrix* COHN (inkl. *Sphaerotilus*). Fäden verzweigt, pseudodichotom; lophotriche Zylindergonidien.
  - b) Fäden pendelnd und langsam kriechend beweglich, ohne Scheide:
    22. Gattung: *Beggiatoa* TREVIS., mit Schwefel.

## 2. System von W. MIGULA<sup>1</sup>.

### Bacteria.

Phykochromfreie Spaltpflanzen mit Teilung nach 1, 2 oder 3 Richtungen des Raumes. Fortpflanzung durch vegetative Vermehrung. Bei vielen Arten Bildung von Ruhezuständen in Form von Endosporen. Beweglichkeit kommt bei einigen Gattungen vor und ist auf Geißeln zurückzuführen. Bei *Beggiatoa* und *Spirochäte* sind die Bewegungsorgane unbekannt.

1. Ordnung: *Eubacteria*. Zellen ohne Zentralkörper, Schwefel und Bacteriopurpurin, farblos oder schwach gefärbt, auch chlorophyllgrün.
  1. Familie: *Coccaceae* (Zopf) MIGULA. Zellen in freiem Zustande vollkommen kugelförmig, in Teilungsstadien oft etwas elliptisch erscheinend.
    1. Gattung: *Streptococcus* BILLROTH. Zellen unbeweglich, rund, Teilung nur nach einer Richtung des Raumes, einzeln, paarweise oder zu perlschnurartigen Ketten vereinigt.
    2. Gattung: *Micrococcus* (Hall) COHN. Die Zellen teilen sich nach zwei Richtungen des Raumes, wodurch sich beim Verbundenbleiben der Zellen nach der Teilung merismopodiaartige Tafelchen bilden können. Bewegungsorgane fehlen.
    3. Gattung: *Sarcina* GOODSIR. Die Zellen teilen sich nach drei Richtungen des Raumes, wodurch, wenn sie nach der Teilung verbunden bleiben, warenballenartig eingeschnürte Pakete entstehen können. Bewegungsorgane fehlen.
    4. Gattung: *Planococcus* n. g. Die Zellen teilen sich nach zwei Richtungen des Raumes wie bei *Micrococcus*, besitzen aber geißelförmige Bewegungsorgane.
    5. Gattung: *Planosarcina* n. g. Die Zellen teilen sich wie bei *Sarcina* nach drei Richtungen des Raumes, besitzen aber geißelförmige Bewegungsorgane.
  2. Familie: *Bacteriaceae*. Zellen länger oder kürzer zylindrisch, gerade, niemals schraubig gekrümmt; Teilung nur nach einer Richtung des Raumes nach vorausgegangener Längsstreckung des Stäbchens.
    1. Gattung: *Bacterium*. Zellen ohne Bewegungsorgane, oft mit Endosporenbildung.
    2. Gattung: *Bacillus*. Zellen mit über den ganzen Körper angehefteten Bewegungsorganen, oft mit Endosporenbildung.
    3. Gattung: *Pseudomonas*. Zellen mit polaren Bewegungsorganen, Endosporenbildung selten.
  3. Familie: *Spirillaceae*. Zellen schraubig gewunden oder Teile eines Schraubenumganges darstellend. Teilung nur nach einer Richtung des Raumes nach vorausgegangener Längsstreckung.

<sup>1</sup> W. MIGULA: Das System der Bakterien, Bd. 1, S. 144. Jena: Lafar 1897.

1. Gattung: *Spirosoma* n. g. Zellen ohne Bewegungsorgane, starr.
2. Gattung: *Microspira*. Zellen mit 1, seltener 2—3 polaren wellig gebogenen Geißeln, starr.
3. Gattung: *Spirillum*. Zellen starr mit polaren Büscheln meist halbkreisförmig gebogener Bewegungsorgane.
4. Gattung: *Spirochaete*. Zellen schlangenartig biegsam, Bewegungsorgane unbekannt.
4. Familie: Chlamydothrixaceae. Zellen zylindrisch, zu Fäden angeordnet, die von einer Scheide umgeben sind. Vermehrung erfolgt durch bewegliche oder unbewegliche Gonidien, welche direkt aus den vegetativen Zellen hervorgehen und, ohne eine Ruheperiode durchzumachen, zu neuen Fäden auswachsen.
  1. Gattung: *Chlamydothrix* n. g. Zellen zylindrisch, unbeweglich, zu unverzweigten, von dicken oder dünnen Scheiden umschlossenen Fäden angeordnet, ohne Gegensatz von Basis und Spitze.
  2. Gattung: *Crenothrix* COHN. Fadenbildende Bakterien, ohne Verzweigung, mit Gegensatz von Basis und Spitze, festsitzend. Scheiden dick, oft mit Eisenocker infiltriert. Zellen anfangs mit Teilung nach einer Richtung, später nach allen drei Richtungen. Die Teilungsprodukte runden sich ab und werden zu Gonidien.
  3. Gattung: *Phragmidiothrix* ENGLER. Zellen zu anfangs unverzweigten Fäden verbunden, sich nach drei Richtungen des Raumes teilend, und so einen Zellenstrang darstellend. Später können einzelne Zellen durch die sehr feine und eng anliegende Scheide hindurchwachsen und zu Verzweigung Veranlassung geben.
  4. Gattung: *Sphaerotilus* (inkl. *Cladothrix*). Zellen zylindrisch, in Scheiden eingeschlossen, dichotom verzweigte Fäden ohne Gegensatz von Basis und Spitze bildend. Vermehrung durch Gonidien, welche aus den Scheiden ausschwärmen, um sich an irgendeinem Gegenstande festzusetzen und sofort zu neuen Fäden auszuwachsen. Gonidien mit einem subpolaren Geißelbüschel.
2. Ordnung: **Thiobacteria**. Zellen ohne Zentralkörper, aber Schwefeleinschlüsse enthaltend, farblos oder durch Bakteriopurpurin rosa, rot oder violett, niemals grün gefärbt.
  1. Familie: Beggiatoaceae. Fadenbildende Bakterien ohne Bakteriopurpurin.
    1. Gattung: *Thiothrix* WINOGRADSKI. Unverzweigte, in feine Scheiden eingeschlossene, unbewegliche, festgewachsene Fäden mit Teilung der Zellen nach einer Richtung des Raumes. Am Ende der Fäden entstehen Stäbchengonidien mit kriechender Eigenbewegung.
    2. Gattung: *Beggiatoa* TREVISAN. Scheidenlose Fäden aus flachscheibenförmigen Zellen gebildet, nach Art der Oscillarien kriechend und um die Achse rotierend, beweglich, frei. Gonidien nicht bekannt.
  2. Familie: Rhodobacteriaceae. Zellinhalt durch Bakteriopurpurin rosa, rot oder violett gefärbt, mit Schwefelkörnchen.
    1. Unterfamilie: *Thiocapsaceae*. Zellen zu Familien vereinigt, Teilung nach drei Richtungen des Raumes.
      1. Gattung: *Thiocystis* WINOGRADSKI. Familien klein, dicht, einzeln oder zu mehreren von einer Gallertcyste umgeben, schwärmfähig.
      2. Gattung: *Thiocapsa* WINOGRADSKI. Familien auf dem Substrat flach ausgebreitet, aus kugelligen, in gemeinsamer Gallerte locker eingebetteten, nicht schwärmfähigen Zellen gebildet.
      3. Gattung: *Thiosarcina* WINOGRADSKI. Familien paketförmig, nicht schwärmfähig, der Gattung *Sarcina* unter den Eubakterien entsprechend.
    2. Unterfamilie: *Lamprocystaceae*. Zellen zu Familien vereinigt. Teilung der Zellen zuerst nach drei, dann nach zwei Richtungen des Raumes.
      1. Gattung: *Lamprocystis* SCHRÖTER. Familien anfangs solid, dann hohlkugelig, netzförmig durchbrochen, endlich in kleine, schwärmfähige Gruppen sich auflösend.
    3. Unterfamilie: *Thiopediaceae*. Zellen zu Familien vereinigt, Teilung nach zwei Richtungen des Raumes.
      1. Gattung: *Thiopedia* WINOGRADSKI. Familien tafelförmig aus quarternär geordneten schwärmfähigen Zellen zusammengesetzt.
    4. Unterfamilie: *Amoebobacteriaceae*. Zellen zu Familien vereinigt, Teilung nach einer Richtung des Raumes.
      1. Gattung: *Amoebobacter* WINOGRADSKI. Zellen zu Familien vereinigt, nach einer Richtung des Raumes sich teilend. Familien amöboid beweglich, Zellen durch Plasmafäden verbunden.
      2. Gattung: *Thiothece* WINOGRADSKI. Familien mit dicken Gallertcysten. Zellen in gemeinsamer Gallerte sehr locker eingelagert, schwärmfähig.
      3. Gattung: *Thiodictyon* WINOGRADSKI. Familien aus stäbchenförmigen, mit ihren Enden zu einem Netz verbundenen Zellen bestehend.

4. Gattung: *Thiopolycoccus* WINOGRADSKI. Familien solid, unbeweglich, aus kleinen, dicht zusammengepreßten Zellen bestehend.
5. Unterfamilie: *Chromatiaceae*. Zellen frei, zeitlebens schwärmfähig.
  1. Gattung: *Chromatium* PÉRTY. Zellen zylindrisch-elliptisch oder elliptisch, verhältnismäßig dick.
  2. Gattung: *Rabdochromatium* WINOGRADSKI. Zellen frei, stab- und spindelförmig, zeitlebens schwärmfähig, mit Geißeln an den Polen.
  3. Gattung: *Thiospirillum*. Zellen frei, zeitlebens schwärmfähig, spiralig gewunden.

### 3. System von K. B. LEHMANN und R. O. NEUMANN.

#### A. Schizomycetales.

1. Familie: *Coccaceae* ZOPF emend. MIGULA. Kugelbakterien.

Zellen in freiem Zustande meist kugelförmig. Teilung nach 1, 2 oder 3 Richtungen des Raumes, indem sich jede Kugelzelle in Kugelhälften, Kugelquadranten oder Kugeloktanten teilt, die wieder zu Vollkugeln heranwachsen. Endosporen sehr selten; Geißeln werden selten beobachtet. Vor der Teilung können die Zellen  $1\frac{1}{2}$ mal so lang wie breit sein, schwache Färbung macht darin leicht eine ungefärbte Teilungslinie sichtbar.

1. Zellen teilen sich fast nur nach einer Richtung des Raumes senkrecht auf die Wachstumsrichtung, so daß sich, wenn die Teilungsprodukte im Zusammenhang bleiben (namentlich in Bouillon), kürzere oder längere rosenkranzartige Ketten bilden; sehr häufig besteht die Kette aus lauter Paaren von Kokken. Unter gewissen Bedingungen kommen statt Ketten nur noch vorwiegend Kokkenpaare zur Beobachtung. *Streptococcus* BILLROTH.

2. Zellen teilen sich, wenigstens auf geeigneten Nährböden (Heudekokk), regelmäßig nach drei Richtungen des Raumes und bleiben in größeren oder kleineren kubischen Familienverbänden vereinigt. *Sarcina* GOODSIR.

3. Die Zellen teilen sich unregelmäßig nach verschiedenen Richtungen, so daß bald einzelne Kokken, bald einzelne Vereinigungen zu 2—4 Zellen, endlich, und zwar vorwiegend, regellose klumpige Haufen entstehen. Hierher gehören alle Formen, die nicht als unzweifelhafte Streptokokken oder Sarcinen erscheinen. *Micrococcus* COHN.

2. Familie: *Bacteriaceae* ZOPF emend. MIGULA (Bacillaceae A. FISCHER). Stäbchenbakterien.

Zellen mindestens  $1\frac{1}{2}$ mal, meist 2—6mal so lang als breit, gerade oder in nur einer Ebene etwas gekrümmt, nie schraubig, zuweilen lange echte oder Scheinfäden bildend. Meist unter  $0,8\mu$  dick. Mit oder ohne Geißeln. Nie Endosporen. Ganz vorwiegend gramnegativ.

Gramnegative aerobe, gewöhnlich geformte Stäbchen. *Bacterium* COHN. emend. HÜPPE.

Gramnegative anaerobe, an den Enden zugespitzte Stäbchen. *Fusobacterium* K. B. LEHM. et KNORR.

Grampositive feinste Stäbchen. *Erysipelathrix* ROSENBACH.

Grampositive aerobe kräftige Stäbchen. *Plocamobacterium* LÖWI.

3. Familie: *Desmobacteriaceae*, höhere Fadenbakterien (Chlamydoacteriaceae MIGULA).

I. Fäden ohne deutliche Scheiden, stets mit runden Schwefelkörnchen; teils festsitzend, teils frei beweglich. *Beggiatoa* TREVISAN.

II. Fäden meist mit Scheiden, zuweilen sind dieselben aber kaum sichtbar oder fehlen wirklich.

a) Ohne Schwefelkörnchen.

1. Ohne pseudodichotome Verzweigung.

a) Ohne Schwärmer. *Leptothrix* KÜTZING, *Chlamydothrix* MIGULA.

β) Mit Fortpflanzung durch begeißelte Schwärmer. *Crenothrix* COHN.

2. Mit pseudodichotomer Verzweigung. *Cladothrix* COHN.

b) Mit Schwefelkörnchen. *Thiothrix* WINOGRADSKY.

4. Familie: *Spirillaceae*. Schraubenbakterien.

Zellen mindestens  $1\frac{1}{2}$ , meist 3—6mal so lang als breit, zuweilen längere Fäden bildend. Stets starr, nicht biegsam. Fäden stets schraubig gekrümmt, so daß sie nicht in einer Ebene liegen, dabei sind die Schraubenstücke oft flach gewunden, daß sie nicht leicht von einem in der Ebene liegenden krummen Stäbchen zu unterscheiden sind. Geißeln, wenn vorhanden, endständig. Stets gramnegativ.

1. Zellen kurz, meist dünn, schwach bogig, kommaartig gekrümmt, zuweilen in schraubenartigen Verbänden aneinanderhängend, stets nur mit einer (ausnahmsweise zwei) endständigen Geißel. Nach HÜPPE mit Arthrosporen. *Vibrio* O. F. MÜLLER emend. LÖFFLER.

2. Zellen lang, oft dicker, spiralig gekrümmt, korkzieherartig, mit einem meist polaren Geißelbüschel aus mehreren langen Haupt- und mehreren kurzen Nebengeißeln. *Spirillum* EHRENBERG emend. LÖFFLER.

5. Familie: *Spirochaetaceae*.

Zellen lang, meist dünn, 5—200mal so lang als breit, stets schraubig gewunden, nicht starr, sondern sehr biegsam. Manche Arten zeigen einen elastischen Achsenfaden. Schlecht färbbar mit Anilinfarben, am besten nach GREMSA. Bewegung nicht durch Geißeln, sondern durch Schlängelung des ganzen Körpers. Das früher einzige Genus *Spirochaeta* wird heute oft in viele kleine Gattungen zerlegt.

6. Familie: *Bacillaceae*. Sporentragende Stäbchenbakterien.

Zellen mindestens  $1\frac{1}{2}$ , meist 4—10mal länger als breit, gerade oder gebogene Fäden bildend. Meist 0,6—1,0  $\mu$  dick, bis 1,5  $\mu$ . Stets Sporenbildung, wenn nicht diese Fähigkeit zufällig verloren ging (asprogene Rassen). Ganz vorwiegend grampositiv. Geißeln meist vorhanden, peritrich.

Einziges Genus mit den Merkmalen der Familie: *Bacillus* COHN emend. HÜPPE.

## B. Actinomycetales.

Dünnfädige chlorophyllfreie Organismen, mit echter Astbildung, zum Teil sogar reich verzweigtem Mycel, teilweise mit Bildung von Conidien. Junge Kulturen zeigen häufig nur spaltpilzartige unverzweigte Stäbchen, die sich keineswegs von den gewöhnlichen Spaltpilzen unterscheiden. Bei vielen Arten besteht Neigung zur Keulen- oder Kolbenbildung am Ende der Fäden. Ausgesprochener Pleomorphismus. Grampositiv.

1. Schlanke, oft etwas gekrümmte Stäbchen, oft mit Neigung zu kolbigen Anschwellungen der Enden. Verzweigungen selten in jungen Kulturen zu sehen, leicht zerbrechend und auch in alten Kulturen oft nur schwer zu finden. Von den meisten Autoren stets unbeweglich gefunden. Bisher keinerlei Sporenformen bekannt. *Proactinomyce-taceae* LEHM. und HAAG.

a) Stäbchen färben sich mit schwachen Farblösungen unterbrochen (Streifung), so daß der Organismus aus verschiedenen färbbaren Stücken zusammengesetzt scheint. Nicht säurefest. Kolbig angeschwollene und keilförmig zugespitzte Stäbchen häufig. *Corynebacterium* L. und N.

b) Stäbchen färben sich mit gewöhnlichen Farblösungen schwer oder überhaupt nicht. Säurefest. Kolbige Anschwellungen der Enden, in der Kultur sehr selten, im Organismus etwas häufiger. *Mycobacterium* L. und N.

2. Mycelfäden lang, dünn, gestreckt oder gekrümmt ohne Scheidewände, mit zarter Scheide und nie fehlender echter Verzweigung. Bildung von mäßig resistenten „Luftsporen“ durch Abschnürung von Conidien. Fragmentation des Fadeninhalts. Manche Arten bilden auffälliges, flockiges Luftmycel. Nie ausgesprochen säurefest. Eigenbewegung fehlt teils, teils ist sie vorhanden. Viele Arten verbreiten einen modrigen Geruch. *Actinomycetaceae* LEHM. und HAAG.

Hierher als einzige Gattung: *Actinomyces* HARZ<sup>1</sup>.

Hinsichtlich der Nomenklatur der Bakterien sei bemerkt, daß sich diese wie die aller Lebewesen nach dem Grundsatz der LINNÉschen binären Benennung zu richten hat. Jede Bakterienart ist daher mit einem Gensnamen (Substantiv) und einem Artnamen (Adjektiv, Genitiv eines Substantivums, seltener Nominativ eines solchen) zu bezeichnen. Leider ist hiergegen, namentlich von seiten ärztlicher Autoren, sehr gefehlt worden. Auch die Einführung biologischer Gattungen wie Aerobakter, Proteobakter ist zu vermeiden, wenn auch gegen Namen wie Photobakterien, denitrifizierende Bakterien u. a., die eine Gruppe biologisch ausgezeichneter Arten bezeichnen sollen, nichts einzuwenden ist.

## In Lebensmitteln verbreitete Bakterien.

Beschreibungen der wichtigsten, in einzelnen Lebensmitteln vorkommenden Bakterienarten werden an den betreffenden Stellen im besonderen Teil folgen. Nachstehend sollen nur einige Formen bzw. physiologische Gruppen, die dem Lebensmittelchemiker häufiger begegnen, kurz Erwähnung finden.

1. Sporenbildner allgemeiner Verbreitung. Hierher gehören die Heubacillen (*Bacillus subtilis*) und die Kartoffelbacillen. Letztere sind Erdbakterien, die, wie die Heubacillen, durch sehr widerstandsfähige

<sup>1</sup> Die Gattung *Actinomyces* wird von den meisten anderen Autoren zu den Eumyceten gerechnet.



Sporen ausgezeichnet sind. Beide verflüssigen sehr rasch die Gelatine. Die Heubacillen wachsen bei günstiger Temperatur (Optimum bei etwa 36°) außerordentlich schnell, jedoch nicht auf sauren Nährböden. Auf flüssigen Nährböden Kahmhautbildung. Von den Kartoffelbacillen ist *Bacillus mesentericus* zu erwähnen, der während der warmen Jahreszeit häufig das Fadenziehen des Brotes und Kuchens verursacht.

2. Fäulnisbakterien sind auf Fleisch und anderen eiweißreichen Lebensmitteln regelmäßig anzutreffen. Gelatine wird verflüssigt. Am bekanntesten ist das *Bacterium vulgare* (*Proteus vulgare*).

*Bacillus botulinus* ist wegen seiner giftigen Stoffwechselprodukte besonders gefährlich (Botulismus). Seine Sporen sind sehr widerstandsfähig.

3. Darmbakterien. Ein typischer Vertreter ist das *Bacterium coli*, das insbesondere für die Wasseruntersuchung von Bedeutung ist. Zum Vergleich kann man es leicht aus Kot durch das Plattenverfahren isolieren. Es wächst in weißen rundlichen, später mehr weinblattartigen Kolonien. Temperaturoptimum bei 37°, wächst aber noch bei 46°. *Coli* ist ein Säurebildner und bringt daher Milch zum Gerinnen. Glucose, Milchzucker und Mannit werden unter Gas- und Säurebildung vergoren. Gelatine wird nicht verflüssigt. Über das Verhalten auf diagnostischen Nährböden vgl. unter Milch und Trinkwasser.

4. Farbstoffbakterien. Hierher gehören verschiedene in der Luft vorkommende Arten wie *Sarcina lutea* und *Sarcina aurantiaca*, das häufig im Wasser vorhandene *Bacterium fluorescens*, das unter gelbgrüner Färbung die Gelatine verflüssigt, sowie das *Bacterium prodigiosum*, der sog. „Hostienpilz“, der auf gekochten Kartoffeln und anderen stärkereichen Lebensmitteln in der warmen Jahreszeit nicht selten die bekannten blutroten Flecke verursacht. Zu nennen ist weiter *Bacterium syncyaneum*, der Erreger der blauen Milch.

5. Essigsäurebakterien. Sie gelangen leicht zur Entwicklung, wenn man alkoholhaltige Flüssigkeiten (wie Bier, Wein, vergorene Fruchtsäfte) bei wärmerer Temperatur in offenen Gefäßen stehen läßt, und bilden an der Oberfläche eine Kahmhaut. Eine gallertartig-knorpelige, sehr zähe Haut bildet das Schleimessigbakterium, *Bacterium xylinum*, der Organismus der „Essigmutter“. *Bacterium xylinum* entwickelt sich zuweilen auch in dünnen Fruchtsirupen, wo es im Hals der Flasche wurstförmige Gebilde erzeugt. In Symbiose mit Hefen bildet es den sog. indischen Teepilz (Kombucha) und liefert das in manchen Gegenden als Teekwaß bezeichnete Getränk.

6. Milchsäurebakterien. Sie sind in der Milch allgemein verbreitet. Die gewöhnlichste Art ist *Streptococcus acidilactici*, der Milch bei Zimmertemperatur säuert, während sich die Milchsäurelangstäbchen (*Lactobacillen*), die im Yoghurt und ähnlichen Sauermilcharten vorkommen, nur bei höheren Temperaturen (40° und darüber) gut entwickeln. Die Sauerkraut- und Sauerteiggärung sowie die Säuerung der Gurken wird gleichfalls durch Milchsäurebakterien verursacht.

7. Buttersäurebakterien. Es sind in allen mit Erde in Berührung kommenden Stoffen anaerob wachsende Organismen, die aus Kohlenhydraten Buttersäure, Butylalkohol und Gas bilden. Meist bewegliche Stäbchen, die bei der Sporenbildung eigenartig spindelförmige (*Clostridium*) oder trommelschlägelförmige (*Plectridium*) Gestalt annehmen. Nach Zusatz von Jodlösung färben sich die Zellen stellenweise oder mit Ausnahme einer kleinen Stelle am Zellende blau (Jogen- oder Granulosereaktion). Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist *Bacillus amylobacter* (*Bacillus saccharobutyricus*). Auch *Bacillus botulinus* (vgl. unter 2.) ist ein Buttersäurebildner.

8. Schwefelbakterien. Sie finden sich fast in allen natürlichen Wässern, die Schwefelwasserstoff enthalten, besonders aber in Schmutzwässern. Charakteristisch ist die Einlagerung winziger Schwefeltröpfchen. Eine der häufigsten Arten ist *Beggiatoa alba*, die man fast in jedem Schmutzwasser beobachtet.

9. Eisenbakterien kommen in reinen eisen- und manganhaltigen natürlichen Wässern vor, daher auch in Wasserleitungen und Reservoirten. Sie lagern in ihren Membranen Eisenhydroxyd ab, das durch Oxydation aus basischem Ferrocyanat entsteht. Die wichtigsten Vertreter sind die Fadenbakterien *Chlamydothrix* (= *Leptothrix*) ochracea und *Crenothrix polyspora* sowie *Gallionella* (*Spirophyllum*) ferruginea.

10. Leuchtbakterien treten selten an Fleischstücken auf und sind fast immer an Seefischen zu finden. Man sieht das Leuchten gewöhnlich erst, wenn man sich einige Minuten in der Dunkelkammer aufhält und dann das Objekt betrachtet.

## B. Eumycetes.

### 1. Vegetative und fruktifikative Organe der Eumyceten.

Die Systematik der Eumyceten baut sich auf Verschiedenheiten des Mycels und der Fruktifikationsorgane auf. Das typische Fadenmycel ist entweder durch zahlreiche Querwände (Septen) in Scheitel- und Binnenzellen geteilt, von denen die Scheitelzellen durch stete Verlängerung und Teilung den Zuwachs besorgen, oder es besitzt keine Querwände, sondern stellt eine einzige vielverzweigte Zelle dar. Nach diesem Verhalten teilt man die Eumyceten in Phykomyceten (Algenpilze) mit unseptiertem (bzw. nur unter gewissen Umständen septiertem) und in Mycomyceten (Scheitelzelpilze) mit septiertem Mycel. Beide Gruppen unterscheiden sich auch wesentlich durch die Art der Fruktifikation, worauf sich ihre weitere Einteilung gründet.

Über den Bau des Eumycetenmycels sei hier noch folgendes erwähnt: Neben dem typischen Fadenmycel kommt bei den Eumyceten häufig auch noch sproßmycel zur Entwicklung, d. h. Mycel, dessen Zellen aus der Mutterzelle nicht durch Streckung und Abgliederung mittels einer Scheidewand, sondern durch Ausstülpung hervorgehen.

Die Pilzfäden (Hyphen) treten bei vielen Eumyceten zu Verbänden bzw. Geweben zusammen. Die einfachsten sind die Fusionen, von denen als häufigste die Anastomosen (Kommunikationen zwischen benachbarten Pilzfäden) zu nennen sind. Eine besondere Art der Zellfusion ist die Schnallenbildung bei den Basidomyceten. Man versteht darunter die Verbindung zweier benachbarter Zellen durch Vorstülpung der Membran neben der Scheidewand, bis Berührung und dann Kommunikation eintritt. Die aus Hyphen gebildeten Gewebe kann man nach dem Vorschlag LINDAUS ohne Rücksicht auf die Art der Verflechtung als Plektenchym bezeichnen. Die einfachste Form ist das Hautplektenchym (Kahmhäute und Pilzdecken). Strangplektenchym ist die Bezeichnung für strangartige Verbände, wozu z. B. die Koremien (S. 1630) gehören. Noch mehr Differenzierung weisen die Fruchtkörper der Hutpilze und das sog. Stroma vieler Arten auf. Kompakte Pilzgewebe, die durch dichte unregelmäßige Verflechtung der Hyphen entstanden sind und auf Querschnitten den Eindruck echter parenchymatischer oder prosenchymatischer Gewebe machen (Abb. 64, 3a und b) heißen Para- oder Prosoplektenchym. Solche Pseudogewebe sind die von manchen Eumyceten gebildeten Sklerotien, myceliale Dauerformen, die eine Gliederung in Rinden- und Markteil zeigen.

Über die wichtigsten Arten der Fruktifikation der Eumyceten, deren Kenntnis für das Verständnis des Systems unerlässlich ist, soll im folgenden eine kurze Übersicht gegeben werden, die zur schnellen Orientierung ausreicht.

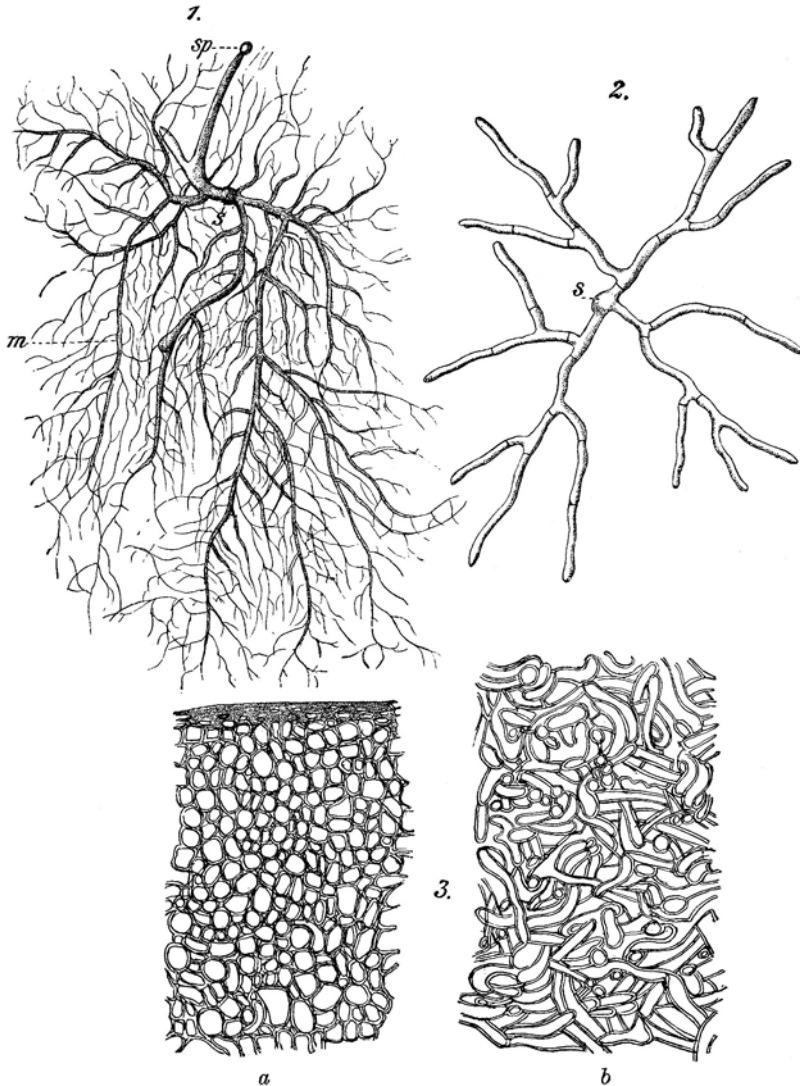


Abb. 64. Myceltypen (360:1).

1. Mycel von *Mucor mucedo* ohne Scheidewände; *s* ausgekeimte Spore; *m* Mycel; *sp* junges Sporangium. 2. Mycel von *Penicillium crustaceum* mit Scheidewänden; *s* ausgekeimte Spore. 3. Sklerotien-  
gewebe von *Claviceps purpurea*; *a* Paraplectenchym vom Rande des Sklerotiums; *b* Prosoplectenchym  
aus der Mitte. (1. nach BREFFELD; 2. nach ZOFF; 3. nach V. TAVEL.)

Für eingehenderes Studium kommt z. B. das Handbuch von W. ZOFF in Betracht sowie das von LAFAR.

Die Fortpflanzung der Eumyceten durch Sporen erfolgt auf geschlechtlichem oder ungeschlechtlichem Wege, und zwar kommen beide Arten der Sporenbildung bei Phykomyceten und Mycomyceten vor. Die geschlechtliche Sporenbildung erfolgt bei den Phykomyceten durch Vereinigung zweier ver-

schiedenartiger Zellen, dem Oogonium und Antheridium (Oosporenbildung) oder zweier gleichartiger Zellen (Zygosporienbildung), von denen hier nur die letztere interessiert. Bei den Mycomyceten ist zwar auch ein Geschlechtsakt nachweisbar, jedoch ist er, soweit die höheren Formen in Betracht kommen, auf Kernverschmelzungen reduziert und daher verdeckt.

Neben den auf geschlechtlichem Wege gebildeten Hauptfruchtformen der Eumyceten (Oosporen-, Zygosporien-, Ascosporen- und Basidiosporienfruktifikation) werden vielfach ungeschlechtlich entstehende Nebenfruchtformen gebildet, die zumeist der schnellen Vermehrung während der günstigen Vegetationszeit dienen (Conidien, Sporangien, Oidien, Gemmen und Chlamydosporen).

#### a) Geschlechtliche Fortpflanzung.

1. Zygosporienfruktifikation. Zygosporien oder Brückensporien kommen nur in einer Familie der Phycomyceten, den Zygomyceten, vor. Diese Sporen entstehen in folgender Weise: Zwei Hyphen wachsen aufeinander zu, berühren sich mit dem Scheitel der infolge starker Plasmaansammlung keulenförmig angeschwollenen Enden, platten sich dort ab und verwachsen (Abb. 65). Die sodann durch je eine Querwand abgegliederten Endzellen (Gameten oder Zygoten) fusionieren hierauf unter Lösung der Zellwand. Die hierdurch entstandene Zelle bildet sich unter starker Vergrößerung zur Zygosporie aus. Außer den Zygosporien entstehen häufig auch Azygosporien (Abbildung 66 und 67), indem die keuligen Anschwellungen zweier Hyphen sich nicht berühren oder die Kopulationszellen sich zwar berühren und verwachsen, aber nicht fusionieren. Jede oder nur eine der Kopulationszellen wird alsdann zur Spore von den Eigenschaften der Zygosporien. Zygosporien und Azygosporien sind Dauerformen kugeligter Gestalt mit sehr dicken Membranen und reichlichen Einlagerungen von Reservestoff (Fett). Die Zygosporien bleiben in den meisten Fällen nackt, seltener umgeben sie sich mit einer aus Hyphen aufgebauten Hülle und bilden eine Zygosporienfrucht.

Zygosporien entstehen nicht bei allen Zygomyceten und außerdem verhältnismäßig selten. Die Bedingungen für ihre Entstehung sind noch wenig erforscht.

2. Ascosporenfruktifikation. Unter Ascosporen versteht man Endosporen, die in einem zunächst schlauchförmigen Behälter, dem Ascus entstehen, der im Gegensatz zum Sporangium (vgl. S. 1629) in jeder Hinsicht einen hohen Grad von Regelmäßigkeit der Ausbildung besitzt, insbesondere eine ganz bestimmte Anzahl von Sporen aufweist. Die Entstehung des Ascus ist mit Befruchtungsvorgängen verknüpft, wie insbesondere P. CLAUSSEN<sup>1</sup>

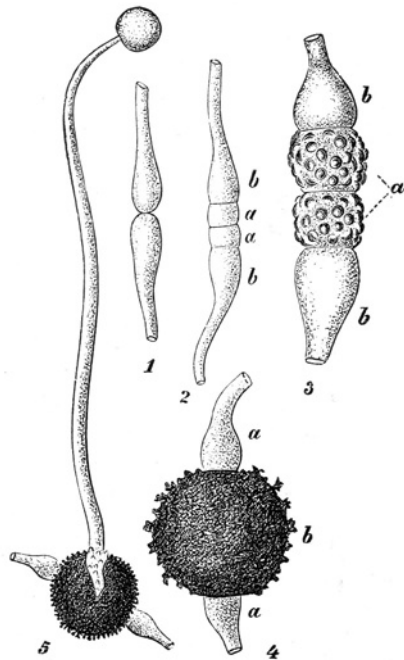


Abb. 65. *Mucor mucedo*. Bildung der Zygosporien (1.—4. 225:1; 5. 60:1).  
1. Zwei Hyphenenden in Scheitelberührung.  
2. Gliederung in Gamete *a* und Suspensor *b*.  
3. Fusion der Gameten *a*. 4. Reife Zygosporie *b* mit Suspensoren *a*. 5. Keimung der Zygosporie zu einem Sporangienträger.  
(Nach O. BREFELD.)

<sup>1</sup> P. CLAUSSEN: Zeitschr. Botanik 1912, 4, 1—64.

festgestellt hat. Durch Kopulation zweier Myceläste entsteht zunächst ein sog. Synkaryon (Ascogon). Aus diesem sprossen die ascogonen Hyphen hervor, die sich am Ende hakenförmig einbiegen und daselbst derartig Querwände ausbilden, daß sich in der vorletzten Zelle zwei Kerne (ein männlicher und ein weiblicher) vorfinden. Durch Verschmelzung der beiden Kerne der vorletzten Hakenzelle wird die Bildung des Ascus eingeleitet, und zwar geht aus dieser Zelle entweder direkt der Ascus hervor, oder es entspringen aus ihr wieder ascogene Hyphen, die das schon geschilderte Verhalten zeigen. Der durch Verschmelzung entstandene Ascuskern teilt sich in 2 Tochterkerne, die sich ihrerseits noch zweimal teilen, so daß schließlich zumeist 8 Kerne vorhanden sind, die die Grundlage ebenso vieler Sporen bilden.

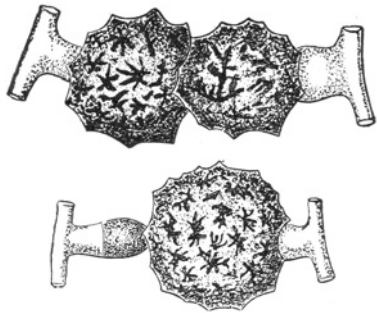


Abb. 66. Azygosporenbildung bei *Mucor erectus*. (Nach BAINIER.)

Aus der letzten und drittletzten Hakenzelle gehen zumeist sterile Hyphen hervor, die entweder als schlauchförmige Füllzellen (Paraphysen) zwischen den Ascis stehen oder diese mit einem Hüllgewebe umgeben. Auf diese Weise kommt es zur Bildung von flächenartigen Schlauchlagern oder von Fruchtkörpern, den sog. Schlauch- oder Ascusfrüchten. Die Schlauchfrüchte sind von einer festen Rindenpartie, dem Peridium, umgeben. Sie sind entweder allseitig geschlossen (kleistokarp) oder sie besitzen eine enge Mündung (perenokarp), oder sie bilden einen Kugelabschnitt, auf dem das Schlauchlager offen liegt (diskokarp). Die diskokarpen Ascusfrüchte heißen Apothezien, die kleistokarpen und perenokarpen Perithezieren. Die Apothezien bilden Scheiben, die Perithezieren sind mehr oder weniger kugelig gebaut und tragen auf ihrer Innenfläche die Ascuslager, in denen zwischen den Ascis meist noch sterile Hyphen (Paraphysen) angeordnet sind. Zuweilen ist die Innenwand der Perithezieren mit sterilen Hyphen (Periphysen) tapeziert. Die Fruchtwand trägt äußerlich manchmal Anhänge.



Abb. 67. *Mucor tenuis*. Azygosporen. (Nach BAINIER.)

Die Ascusfrüchte sind mitunter zu mehreren in einem sterilen Gewebe, dem Stroma, in regelmäßiger Anordnung eingebettet. Auf diese Weise entstehen die Fruchtkörper höherer Ordnung, die kugelig oder keulig geformten Stromata.

Außer dem vorstehend geschilderten Typus der Ascusbildung sind noch zwei weitere, aber seltener vorkommende, bekannt.

Alle Pilze, die Ascosporen bilden, faßt man als Schlauchpilze, oder Ascomyceten zusammen. WETTSTEIN stellt die Schlauchpilze, die keine ascogonen Hyphen bilden, als Protoasci, den Euasci gegenüber, bei denen solche gebildet werden.

3. Basidiosporenfruktifikation. Als Basidiosporen bezeichnet man exogen entstehende Fortpflanzungszellen, die von etwa keulenförmigen Trägern, den Basidien, in bestimmter Zahl (zumeist 4) abgeschnürt werden und diesen mittels feiner Stielchen (Sterigmen) aufsitzen. Das Verhältnis der Basidiosporen zu den ebenfalls exogen entstehenden Conidien (vgl. S. 1622) ist äußerlich betrachtet ein ähnliches wie das der Ascosporen zu den Sporangiumsporen, indem sich Basidio- wie Ascosporen durch die Regelmäßigkeit der Ausbildung von den anderen unterscheiden.

Auch bei der Basidiosporenbildung lassen sich nach KNIEP<sup>1</sup> Befruchtungsvorgänge nachweisen, obwohl äußerlich erkennbare Sexualorgane nicht ausgebildet werden. Hierbei spielt die oben erwähnte Schnallenbildung (vgl. S. 1625) eine Rolle. Die Basidien sind vielfach zu einer Fruchtschicht, dem Hymenium, vereinigt, das die Oberfläche des verschiedenartig gestalteten Fruchtschichtträgers (Hymenophors) bekleidet und außer den Basidien noch sterile Zwischenfäden (Paraphysen) und zuweilen auch auffallend gestaltete Gebilde (Cystiden) enthält, die nach KNOLL<sup>2</sup> den Charakter von Hydathoden haben.

Das Hymenium ist entweder frei angelegt, oder durch später reißende Hüllen geschützt oder es überzieht die Wände von Höhlungen in ganz geschlossenen Fruchtkörpern, wie bei den Bauchpilzen (*Gasteromyce-*ten). Bei letzteren unterscheidet man die äußere Hülle (Peridie) von dem inneren fleischigen Hymenophor, der sog. Gleba.

Die Basidienbildung ist das Hauptmerkmal für die große Klasse der Basidiomyceten. Die Basidiomyceten mit typischen ungeteilten Basidien werden als Autobasidii, die mit geteilten als Protobasidii und die mit unregelmäßig geformten als Hemibasidii bezeichnet.

b) Ungeschlechtliche Fortpflanzung.

Die hier in Betracht kommenden Formen können auf endogenem, exogenem oder intercalarem Wege entstehen. Bei der endogenen Vermehrung werden die Fortpflanzungszellen im Innern eines Behälters (Sporangiums) gebildet, bei der exogenen von einem Träger abgeschnürt, bei der intercalaren durch einfachen Zerfall einer vegetativen Hyphe erzeugt.

1. Sporangienfruktifikation (endogene Vermehrung). Als Sporangium bezeichnet man bei den Eumyceten eine Pilzzelle, die in ihrem Innern (also endogen) Sporen (daher Endosporen genannt) hervorbringt. Sind die Endosporen membranlos und durch den Besitz von Cilien schwärmfähig, so heißen sie Schwärmosporen, die Sporangien Schwärm- oder Zoosporangien. Schwärmsporangien kommen nur bei einigen an das Wasserleben angepaßten Phykomyceten vor. Bei den niedersten Phykomyceten wird der ganze Thallus oder nur seine äußersten Spitzen in ein Sporangium verwandelt. Bei

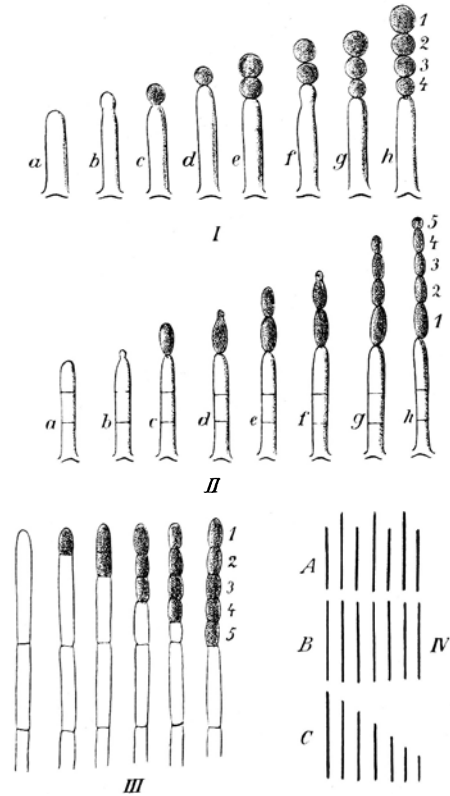


Abb. 68. I. Schematische Darstellung der Bildung einer Conidienkette in basipetaler Folge; 1, älteste, 4, jüngste Conidie. II. Schematische Darstellung der Bildung einer Conidienkette durch terminale Sprossung (basifugal); 1.-5. Altersfolge der Conidien. III. Bildung einer Conidienkette in basipetaler Folge ohne Streckung des Trägers; 1.-5. Altersfolge der Conidien. IV. Graphische Darstellung des Verhaltens der Conidienträger bezüglich ihrer Länge in den 3 Typen. (Nach W. Zoppf.)

<sup>1</sup> KNIEP: Zeitschr. Botanik 1915, 7, 369.

<sup>2</sup> KNOLL: Jahrb. wiss. Botanik 1912, 50, 453.

den höheren Phykomyceten (z. B. bei den hier interessierenden Mucoraceen) entsteht das Sporangium an der Spitze besonderer sich aus dem Mycel erhebender

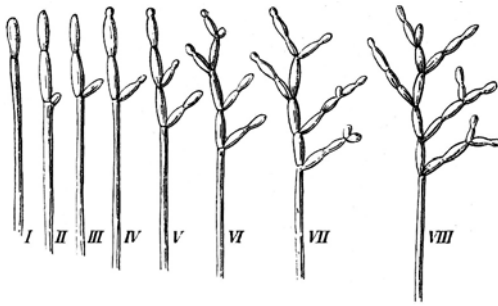


Abb. 69. Conidienträger von *Hormodendron cladosporioides* in der Ausbildung eines Sporoconidienstandes. (Nach E. Löw.)

Hyphen (Stiel oder Träger des Sporangiums). Bei der Sporenbildung wird nicht immer das ganze im Sporangium enthaltene Plasma aufgebraucht, sondern es bleibt häufig ein Teil davon zurück, um bei der Ejakulation der Sporen als Quellungsmittel zu wirken.

Die Kammerungswand, mit der sich das Sporangium vom Träger abgrenzt, ist häufig halbkugel- bis säulenförmig in das Innere des Sporangiums hineingewölbt und wird dann als Colu-

mella bezeichnet. Sie bleibt nach dem Aufreißen des Sporangiums zurück, oft von Resten der Sporangienwand an ihrer Basis kragenartig umgeben.

2. Conidienfruktifikation (exogene Vermehrung). Unter Conidien oder Exosporen versteht man Fortpflanzungszellen, die meist an besonderen, aufwärts gerichteten Tragzellen (Conidienträgern) durch Abschnürung entstehen. Entwicklungsgeschichtlich ist die Conidie als einsporiges Sporangium, bei dem Sporen- und Sporangienwand verwachsen sind (Schließsporangium), anzusehen. Zwischenstufen dieser Entwicklung finden sich bei einigen höheren Phykomyceten vor.

Die Conidien entstehen am Träger entweder in basipetaler oder in basifugaler (acropetaler) Folge. Im ersteren Falle (z. B. bei *Penicillium* und *Aspergillus*) ist die unterste Conidie, im zweiten (z. B. bei *Cladosporium*) die oberste die jüngste. Bei der acropetalen Bildung bilden sich die Conidien durch Sprossung. Die Ketten können sich in diesem Falle auch durch seitliche Sprossungen verzweigen, so daß Conidiensproßverbände entstehen. Eine dritte Art der Conidienbildung ist die der Aufteilung des Trägers in basipetaler Folge. Dieser Fall ist seltener (Abb. 68 und 69).

Die Conidien sind anfangs einzellig. Bei vielen Formen werden sie durch Bildung von Scheidewänden auch mehrzellig.

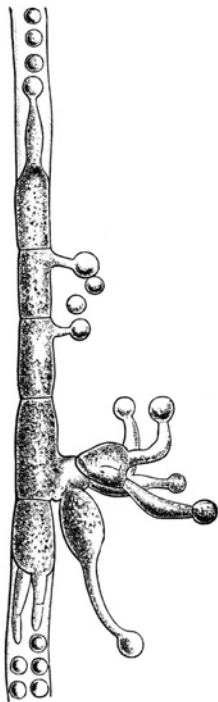


Abb. 70. Durchwachsungserscheinungen bei *Botrytis cinerea*. (Nach P. LINDNER.)

Der Conidienträger ist eine ein- oder mehrzellige unverzweigte oder in verschiedenster Weise verzweigte Hyphe mannigfaltigster Form. Die Conidienträger kommen entweder vereinzelt oder in Verbänden vor. Sie können zu Bündeln (Koremien) zusammentreten, indem sich die Tragzellen der Länge nach zusammenlegen und eine Säule bilden, oder zu Conidienlagern, indem

zahlreiche Träger nebeneinander in einem Lager (Hymenium) entstehen, oder sie entstehen in Gehäusen, die als Conidienfrüchte oder Pykniden bezeichnet werden und mit einer Scheitelöffnung zur Entleerung der Conidien versehen sind.

Erwähnt sei an dieser Stelle noch die sog. innere Conidienbildung. Wenn in einem Mycelfaden einzelne Zellen absterben, so treiben zuweilen die angrenzenden gesunden Zellen einen Schlauch in die toten Zellen und bilden dort Conidien. Diese Durchwachungserscheinungen (Abb. 70) sind z. B. bei *Botrytis* beobachtet worden.

3. Oidien-, Gemmen- und Chlamydosporenfruktifikation. Den Zerfall von Hyphen in zahlreiche Teilstücke, die der Fortpflanzung dienen, also Sporencharakter haben, bezeichnet man als intercalare Vermehrung. Hierher gehört die Bildung von Oidien (Abb. 71 und 72), die zylindrische Teilstückedarstellen, Kugelzellen und Kugelhefen, von denen bei den letzteren Vermehrung durch Sprossung zu beobachten ist. Während diese Formen vegetativen Charakter haben, da sie sogleich wieder keimen, sind die Chlamydosporen (Abb. 71, 3 und 4) und Gemmen als Ruheformen charakterisiert. Sie entstehen aus Mycelhyphen durch Zusammenziehung des Inhalts unter Ausbildung einer dickeren Membran, sind durch reichlichen Gehalt an Reservestoffen ausgezeichnet und keimen erst nach einem mehr oder minder ausgeprägten Ruhestadium. Bilden sich die Gemmen an einem Hyphenende, so nennt man sie Stielgemmen, bei intercalarer Entstehung in Reihen dagegen Reihengemmen. Erzeugen sie bei der Keimung sofort Fruchträger und nicht vegetatives Mycel, so bezeichnet man sie als Chlamydosporen. Jedoch werden die Bezeichnungen Gemmen und Chlamydosporen von den einzelnen Autoren in der verschiedensten Weise gebraucht (vgl. auch die Ausführungen im Abschnitt „Phycomyceten“ S. 1635).

Von den vorstehend beschriebenen Fruktifikationsformen erzeugen manche Pilze nur eine (monomorphe), manche mehrere (pleomorphe). Die Zygosporen-, Ascus- und Basidienfruktifikation bezeichnet man im allgemeinen

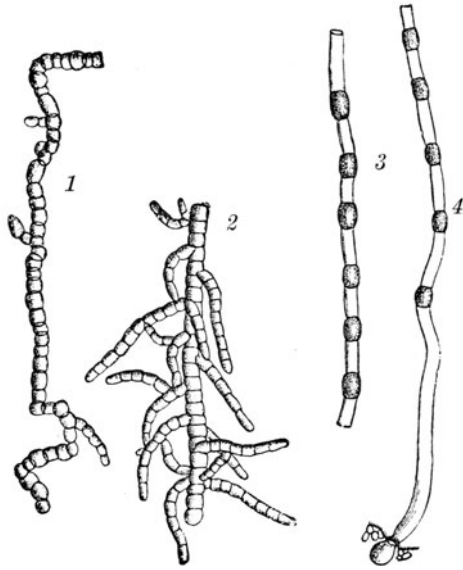


Abb. 71. *Chlamydomucor racemosus* Brefeld (1. und 2. 120:1; 3. und 4. 80:1). 1. und 2. Mycelstücke, die sich in Oidienketten umgewandelt haben; 3. Hyphe mit 6 Chlamydosporen; 4. Sporangiumträger mit 5 Chlamydosporen. (Nach O. BREFFELD.)

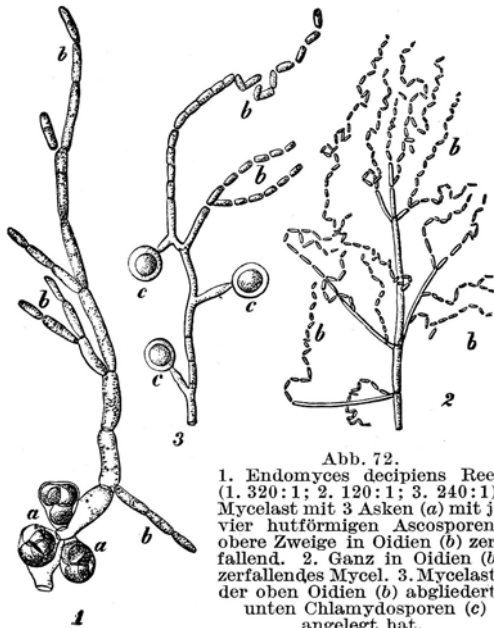


Abb. 72. *Endomyces decipiens* Rees (1. 320:1; 2. 120:1; 3. 240:1). Mycelast mit 3 Asken (a) mit je vier hutförmigen Ascosporen: obere Zweige in Oidien (b) zerfallend. 2. Ganz in Oidien (b) zerfallendes Mycel. 3. Mycelast, der oben Oidien (b) abgliedert, unten Chlamydosporen (c) angelegt hat.



als Haupt-, die Conidien-, Sporangien-, Gemmenfruktifikation als Nebenfruchtformen. Am weitesten verbreitet ist die Conidienfruktifikation, dagegen kommen Sporangien nur bei Phycomyceten vor.

Von vielen Pilzen kennt man zur Zeit nur Conidienfruktifikationen. Sie werden deshalb als Fungi imperfecti bezeichnet. Eine große Zahl von ihnen dürfte zu den Ascomyceten gehören.

## 2. Einteilung der Eumyceten und Beschreibung der in Lebensmitteln häufigeren Arten.

Die Einteilung der Phyko- und Mycomyceten in Unterabteilungen ist bei den einzelnen Autoren eine verschiedene. Im folgenden soll die von G. LINDAU<sup>1</sup> gegebene Systematik zugrunde gelegt werden.

I. Klasse: *Phycomycetes*.

1. Unterklasse: *Oomycetes*.

2. Unterklasse: *Zygomycetes*.

II. Klasse: *Mycomycetes* (S. 1639).

3. Unterklasse: *Ascomycetes* (S. 1639).

4. Unterklasse: *Basidiomycetes* (S. 1652).

In LINDAU-ULBRICH<sup>2</sup> findet sich als neueste Einteilung die Aufstellung von vier Klassen: Archimycetes, Phycomycetes, Ascomycetes und Basidiomycetes.

### I. Klasse: *Phycomycetes, Algenpilze*.

Mycel unseptiert, nur in älteren Mycelteilen einige Kammerungswände, die den vorderen plasmaführenden Teil gegen den hinteren abgrenzen. Häufig geschlechtliche Fortpflanzung. Befruchtung teils durch verschiedenartige, teils durch gleichartige Zellen. Bei den Wasserformen Schwärmsporangien, bei den Landformen auch Conidien.

#### 1. Unterklasse: *Oomycetes*.

Mycel entweder wenig entwickelt oder häufiger schlauchförmig, verzweigt oder unverzweigt, unseptiert. Geschlechtliche Fortpflanzung durch Oosporenbildung. Meist Wasserformen (außer Peronosporineae); Schwärmsporangien, bei Landformen auch Conidien.

Erwähnt seien aus dieser Unterklasse die Chytridiineae, die Saprolegniineae und die Peronosporineae.

Die Chytridiineae sind sehr einfach organisierte Formen, die meist parasitisch in Tieren und Pflanzen leben und an das Leben im Wasser oder in feuchten Substraten angepaßt sind. Ein Mycel fehlt ganz oder ist nur noch in Andeutungen vorhanden. Fortpflanzung durch Schwärmsporen, die in Sporangien oder Dauersporen entstehen.

Von dieser Reihe interessiert hier nur die die krebssigen Wucherungen an Kartoffelknollen verursachende *Chrysophlyctis endobiotica* SCHILB.

Aus der Reihe der Saprolegniineae sind einige Wasserbewohner der Gattungen *Saprolegnia*, *Achlya* und *Leptomitus* zu nennen; zur Reihe der Peronosporineae gehören parasitisch in Kartoffelknollen (*Phytophthora*) und auf Weinbeeren (*Plasmopara*) lebende Arten (vgl. diese Abschnitte).

#### 2. Unterklasse: *Zygomycetes (Jochpilze)*.

Die Zygomyceten zerfallen in zwei Ordnungen: die Mucorineae und die Entomophthorineae, von denen für die Nahrungsmittelmykologie nur die erste von Bedeutung ist. Die Mucorineen besitzen ein reich verzweigtes,

<sup>1</sup> G. LINDAU: Die mikroskopischen Pilze. Berlin 1922.

<sup>2</sup> LINDAU-ULBRICH: Die höheren Pilze, 3. Aufl. Berlin 1930.

unseptiertes, nur in besonderen Fällen septiertes Mycel. Sie sind besonders gekennzeichnet durch die Bildung von Zygosporen (auch Azygosporen), die aber nicht bei allen Formen beobachtet ist. Ferner bilden sie Sporangiensporen, zuweilen Chlamydosporen bzw. Gemmen und kleine Mycelconidien. Zu den Mucorineen gehört eine Reihe der wichtigsten, weitverbreiteten Schimmelpilze, die sog. Köpfchenschimmel; sie bilden die hier allein interessierende Familie der Mucoraceen. Für die Unterscheidung der Mucoraceen-Unterfamilien und -Gattungen diene folgende Übersicht:

## Mucoraceae.

Mucorineen mit vielsporigen Sporangien, die stets eine Columella, d. h. ein in das Sporangium vorgewölbtes, mehr oder weniger aufgetriebenes Ende des

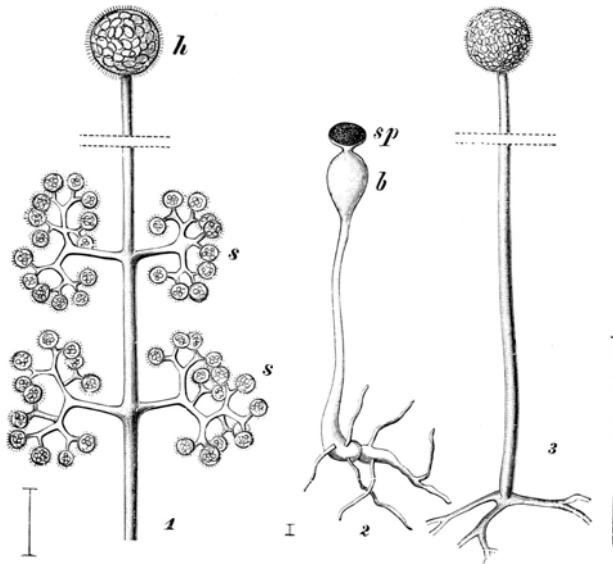


Abb. 73. Sporangienträger der drei Mucoraceen-Unterfamilien (Thamnidiaceen, Piloboleen, Mucoreen) (1. 130:1; 2. 30:1; 3. 40:1).  
 1. *Thamnidium elegans* Link mit einem Hauptsporangium (*h*) und zahlreichen Nebensporangien (Sporangiolen) (*s*); 2. *Pilobolus Kleinii* v. Tiegh. mit abschleuderbarem schwarzen Sporangium (*sp*) und subsporangiole Blase (*b*); 3. *Mucor mucedo* (L) Bref., wie andere Mucorarten mit einerlei nicht abschleuderbaren Sporangien. (1. und 2. nach BAINIER; 3. nach WEHMER.)

Sporangiumträgers besitzen. Zygosporen nackt oder locker umhüllt. Da die Zygosporen bei vielen Mucoraceen sowie auch die Bedingungen für ihre Entstehung in Kulturen noch wenig bekannt sind, da sie außerdem auch keine besonders kennzeichnenden Merkmale besitzen, so ist für die Einreihung einer unbekannteren Form das Vorhandensein eines Sporangiums mit Columella von Wichtigkeit. In den folgenden kurzen Beschreibungen wird daher meist von einer eingehenden Schilderung der Zygosporen Abstand genommen.

1. Unterfamilie: Mucoreae. Nur eine Art vielsporige Sporangien, die sich auf dem Träger durch Verquellen oder Zerbrechen der Membran entleeren.

2. Unterfamilie: Thamnidiaceae. Zweierlei Sporangien, vielsporige Hauptsporangien, wenigsporige Nebensporangien (Sporangiolen). Öffnung der Hauptsporangien wie bei den Mucoreen. Sporangiolen fallen als Ganzes ab. Die Sporen beider Sporangienarten stimmen überein.

3. Unterfamilie: Piloboleae. Festwandige Sporangien, die ganz mit oder ohne Columella abfallen oder abgeschleudert werden.

Von diesen drei Unterfamilien (Abb. 73) kommt die dritte hier nicht in Betracht.

Von den Gattungen der Mucoreen interessieren hier nur *Mucor*, *Rhizopus*, *Phykomyces*, von denen der Thamnidieen *Thamnidium*.

Die Gattung *Mucor* ist durch kugelige Sporangien an den Enden einfacher, seltener verzweigter Sporangienträger ausgezeichnet. Die Columella

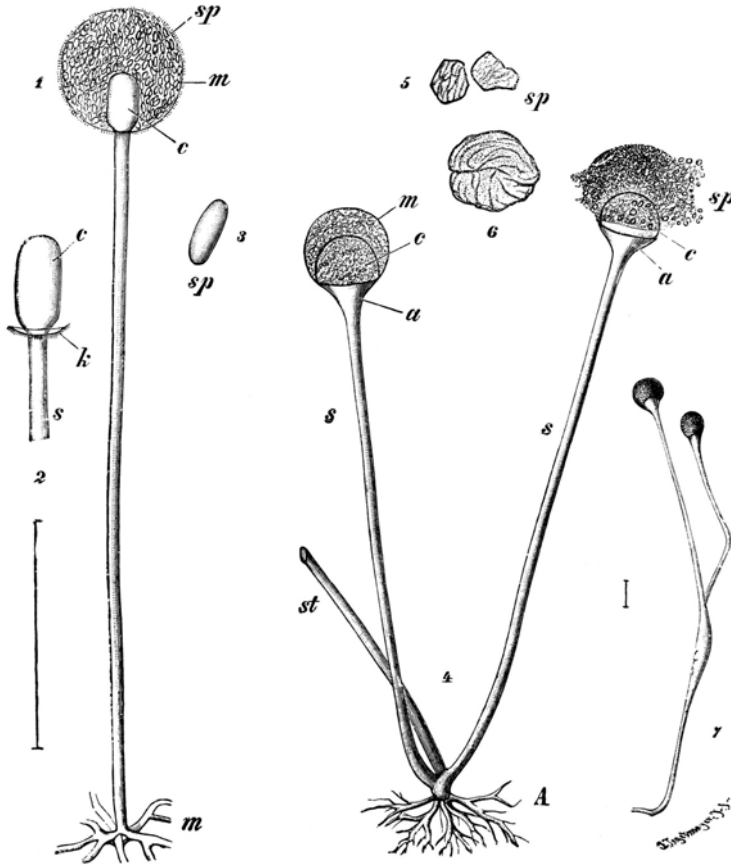


Abb. 74. Sporangienträger und Sporen von *Mucor* und *Rhizopus* (1. 50:1; 2. 100:1; 3. 400:1; 4. 50:1; 5. 500:1; 6. 1200:1; 7. 20:1).

1.—3. *Mucor Mucedo* Bref. mit Columella (c), ohne Apophyse und glatten abgerundeten Sporen (3, sp). 4.—7. *Rhizopus nigricans* Ehrenbg. mit einer der Apophyse (a) aufsitzenden Columella (c), schwach eckigen feingestreiften Sporen (5, 6, sp) und zweierlei Sporangienträgern: einfachen (4), der Anheftungsstelle (A) des Stolo (st) neben Rhizoiden entspringenden und verzweigten (7), direkt dem Mycel entspringenden, aus den nicht gezackten und keine Rhizoiden entwickelnden Stolo hervorgehenden; m Sporangiumrand, k Kränenrest.

(4. Nach ZOPF; 6. und 7. nach W. VUILLEMIN; das übrige nach WEHMER.)

ist nicht aufsitzend, d. h. die Sporangienwand setzt sich unterhalb der Anschwellung des Stieles an diesen an. Der Träger besitzt keine Apophyse (blasige Erweiterung unter der Columella) und ist nie gabelig oder wirtelig geteilt. Luftmycel (Ausläufer [Stolonen] mit Rhizoiden) fehlend. Epispor glatt. Sporen ellipsoidisch oder kugelig.

Die Gattung *Rhizopus* (Abb. 74, 4—7) ist von *Mucor* besonders durch die Rhizoiden tragenden Ausläufer (Stolonen), eckige Sporen mit faltigem Epispor und die der Apophyse aufsitzende Columella ausgezeichnet. Ferner

sind die Membranen der vegetativen Hyphen und Sporangienträger meist braun gefärbt, die der Mucorarten farblos. Die Sporangienträger entstehen an den Ausläuferknoten (Anhaftungsstellen) büschelförmig. Zygosporen sind bei Rhizopusarten selten, bei Mucorarten häufiger beobachtet worden.

Die Gattung *Phycomyces* unterscheidet sich von *Mucor* nur durch die mit dichotom verzweigten Dornen versehenen Suspensoren der Zygosporen.

Über die bei den Mucoreen öfter auftretenden Chlamydosporen (Gemmen) und Kugelzellen (Abb. 75) sei hier folgendes erwähnt: WEHMER trennt beide scharf, indem er als Chlamydosporen oder Gemmen nur innerhalb des Thallus durch Kontraktion des Plasmas und Bildung einer neuen, meist dicken Haut entstehende einzellige Organe mit Sporencharakter bezeichnet, die unter

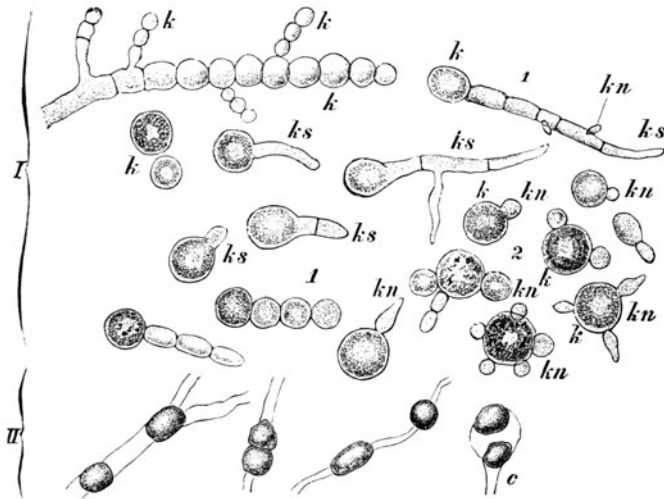


Abb. 75. Kugelzellen, Kugelhefe und Gemmen bei Mucoreen (I. 300:1; II. 250:1). I. Kugelzellbildung bei *Mucor javanicus* Wehm. im Gärungssaccharometer; 1. Auswachsen zu wieder zerfallenden Keimschläuchen; 2. Knospenbildung (Kugelhefe), *k* Kugelzellen, *ks* Keimschläuch, *kn* Knospen. II. Gemmenbildung bei *Mucor plumbeus* Bon. (*M. spinosus* v. Tiegh.) in Hyphen und Columella (c). (Nach WEHMER.)

geeigneten Bedingungen sich zu neuen Mycelien entwickeln. Sie sind an keine bestimmte Form gebunden (oval, kugelig, langgestreckt) und liegen in den entleerten Fäden vereinzelt, auch reihenweise hintereinander. Sie sind normale Bildungen, die hauptsächlich an submersen Mycelteilen auftreten. Die Kugelzellen (auch Oidien oder Reihengemmen genannt) entstehen dagegen durch Zerfall der Hyphen, also wie die Oidien bei *Oidium lactis* (siehe dort) und ähnlichen Hyphenpilzen. Die Teilstücke bleiben zunächst im Verbande oder zerfallen unter Abrundung und oft starker Volumenvergrößerung. Sie sind nach WEHMER abnorme Bildungen (Septenbildung bei *Phycomyces*!), die nur unter ungünstigen Lebensverhältnissen, besonders bei Abschluß des Luftsaurostoffes entstehen. Die Kugelzellen können sofort zu neuen Fäden auswachsen oder nur ihr Volumen vergrößern oder die Membran verdicken und sich so gestaltlich den Gemmen nähern. Falls die Kugelzellen nur eine kurze Knospe treiben, so entsteht die sog. Kugelhefe, die aber nicht mit der Sprossung der Saccharomyceten in Parallele gestellt werden kann. Andere Forscher wie KLÖCKER stellen die Kugelzellen zu den Chlamydosporen. Ein Zusammenhang zwischen Kugelhefe und der bei fast allen Mucoreen beobachteten alkoholischen Gärung besteht nicht, denn die alkoholische Gärung tritt bei Luftzutritt und

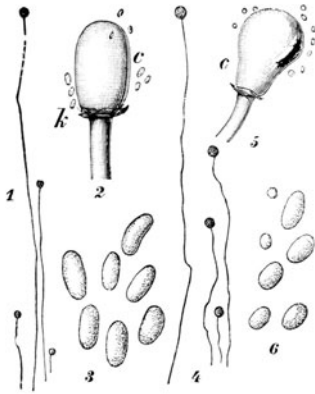


Abb. 76. Monomucor-Arten  
(2. 100:1; 3. 630:1; 5. 70:1;  
6. 700:1).  
1.-3. *Mucor mucedo* (L) Brefeld. 4.-6. *M. piriformis* A. Fischer in natürlicher Größe mit schwach vergrößertem Sporangium; c Columella, k Kragenrest.  
3., 6. Sporen. (Nach WEHMER.)

bei der Entwicklung der Pilze in normalen Fadenmycelien genau so stark ein wie bei Luftabschluß.

Beschreibung der wichtigsten Arten der Gattungen *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Thamnidium*.

Gattung *Mucor*. Die Charakterisierung der Mucorarten stößt auf große Schwierigkeiten, da besonders die in erster Linie zur Unterscheidung heranzuziehende Sporangienfruktifikation je nach den Kulturbedingungen auch bei derselben Art die allergrößten Variationen zeigt. Vergleiche mit lebendem, genau bestimmtem Material und Heranziehung physiologischer Merkmale sind unerlässlich. Im folgenden halten wir uns im wesentlichen an die Angaben von WEHMER<sup>1</sup> und JANKE<sup>2</sup>.

***Mucor Mucedo* (LINNÉ) BREFFELD** (Abb. 74 u. 76) bildet auf Lebensmitteln hohe, graue Rasen; Sporangienträger unverzweigt, bis 4 cm, zuweilen

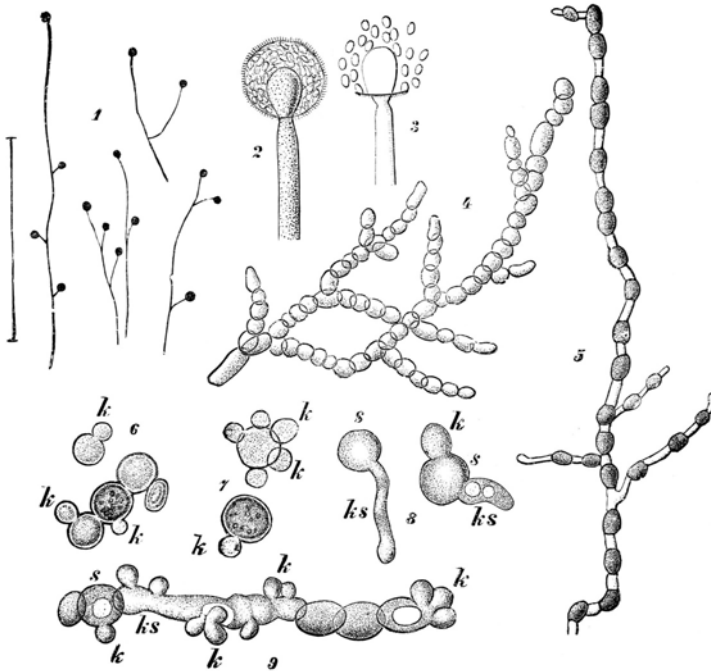


Abb. 77. *Mucor racemosus* Fresenius (1. 2:1; 2. und 3. 300:1; 4. 120:1; 5. 80:1; 6.-9. 300:1).  
1. Sporangienträger; 2. Sporangium; 3. Columella; 4. Kugelzellen (Oidien); 5. Gemmen; 6.-7. sprossende Kugelzellen (Kugelhefe), k Knospen; 8. mit Keimschlauch (ks) auswachsende Sporen; 9. junge Hyphe, in Zerfall und knospend (k).  
(1. Nach WEHMER; 2.-5. nach BREFFELD; 6. und 7. nach PASTEUR; 8. und 9. nach REESS.)

etwa 10 cm hoch, Sporangien kugelig, zuerst orangefarben, dann graubraun, 100—200  $\mu$  dick, mit Nadelchen von Calciumoxalat dicht besetzt. Columella

<sup>1</sup> WEHMER: In LAFAR: Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4.

<sup>2</sup> JANKE: Allgemeine technische Mikrobiologie. Dresden 1924.

stark vorgewölbt, zylindrisch, bis  $120\ \mu$  lang; Sporen ellipsoidisch, nach WEHMER  $12\text{--}18\ \mu$ , zuweilen bis zu  $24\ \mu$  lang, aber auch merklich kleiner. Bildet keine Gemmen, Kugelzellen und Kugelhefe. Zygosporien schwarz, warzig, feinstachelig (Abb. 65),  $90\text{--}250\ \mu$ , aber auch bis zu 1 mm dick.

**Mucor piriformis** A. FISCHER (Abb. 76) bewirkt Fäulnis von

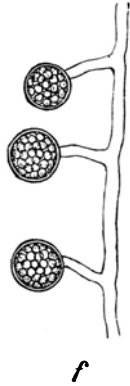


Abb. 78. *Mucor racemosus* Fresenius (230:1). Drei Sporangien mit durchsichtiger Membran, durch die die Sporen schimmern. (Nach FISCHER.)

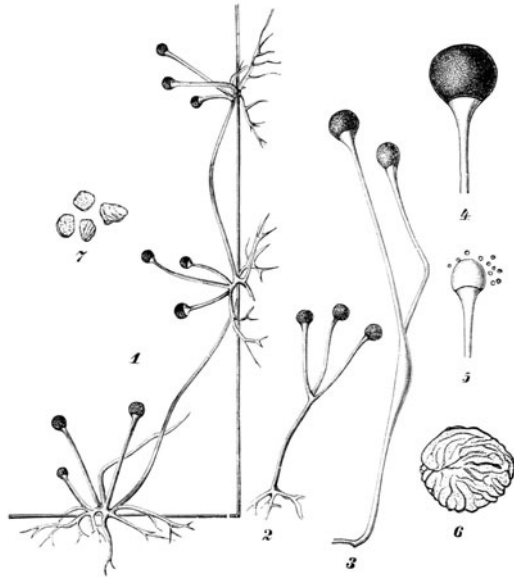


Abb. 79. *Rhizopus nigricans* Ehrenberg (1. und 2. 8:1; 3. 20:1; 4. und 5. 50:1; 6. 1200:1; 7. 300:1). 1. Stolo, der an einer senkrechten Glaswand Rhizoiden neben unverzweigten Sporangienträgern erzeugt; 2. und 3. verzweigte Sporangienträger direkt aus dem Substratmycel hervorgehend; 4. Sporangium; 5. Columella und Apophyse; 6. eine Spore mit faltigem Epispore; 7. Sporen schwächer vergrößert. (3. und 6. nach VUILLEMIN; das übrige nach WEHMER.)

Obst, zumal von Birnen. Sporangienträger unverzweigt, je nach den Bedingungen einige Millimeter bis zu 8 cm, im Mittel 1—3 cm hoch, gewöhnlich dicht mit feinen Wassertröpfchen bedeckt. Kugelige, bis  $400\ \mu$  große, im Alter braunschwarze Sporangien. Columella meist birnenförmig, aber auch oval bis kugelig.  $80\text{--}65:300\text{--}280\ \mu$ . Sporen meist ellipsoidisch  $5\text{--}13:4\text{--}8\ \mu$ . Zygosporien sind nicht bekannt, dagegen Kugelzellen und derbwandige Gemmen. Charakteristisch ist die Bildung eines intensiven Frucht-estergeruches auch in Kulturen.

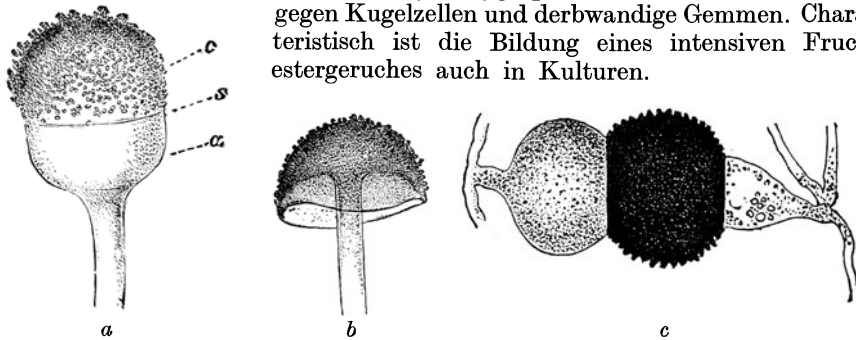


Abb. 80. *Rhizopus nigricans* Ehrenberg (a und b 100:1; c 90:1). a Columella (c) mit dem unteren freien Teil (a), bei s Ansatzstelle der zerflossenen Sporangienwand; b zusammengesunkene, hutpilzartige Columella, ebenso wie die vorige mit Sporen bedeckt; c reife warzige Zygosporien. (a und b nach FISCHER; c nach DE BARY.)

**Mucor racemosus** FRESENIUS (Abb. 77 und 78) lebt in grauen bis hellbraunen Rasen auf den verschiedensten pflanzlichen und tierischen Substraten (Brot, Früchten, Milch, Käse). Sporangienträger oft überwiegend unverzweigt,

zum Teil cymös oder racemisch verzweigt, 2—3 cm hoch. Sporangien klein, bis zu  $50\mu$  im Durchmesser, gelblich oder bräunlichgelb, mit durchsichtiger, gewöhnlich nicht feinstacheliger Wand. Columella oval bis verkehrt eiförmig, im Mittel  $22\mu$  hoch,  $17\mu$  dick, Sporen glatt, farblos, ellipsoidisch etwa  $6:4,2\mu$ . Zygosporen mit warzigem Exospor,  $70-80\mu$  dick; auch Azygosporen, Gemmen (Chlamydo-sporen) werden reichlich gebildet. Das untergetauchte Mycel zerfällt bei Luftmangel in zuckerhaltigen Flüssigkeiten in Kugeln, die spärlich sprossen. Der Pilz bildet in Zuckerlösungen geringe Mengen Alkohol.

*Mucor erectus* BAINIER ähnelt *Mucor racemosus*, kommt in 1 cm hohen Rasen auf Vegetabilien vor.

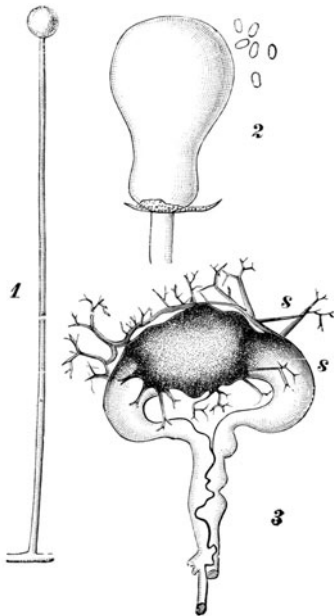


Abb. 81. *Phycomyces nitens* (Ag.) Kunze (1. 50:1; 2. 85:1; 3. 50:1). 1. Sporangienträger; 2. Columella mit Sporen; 3. Zygosporangium mit dornigen Suspensoren. (1. Nach WEHMER; 2. nach A. FISCHER; 3. nach VON TIEGHEM und LE MONNIER.)

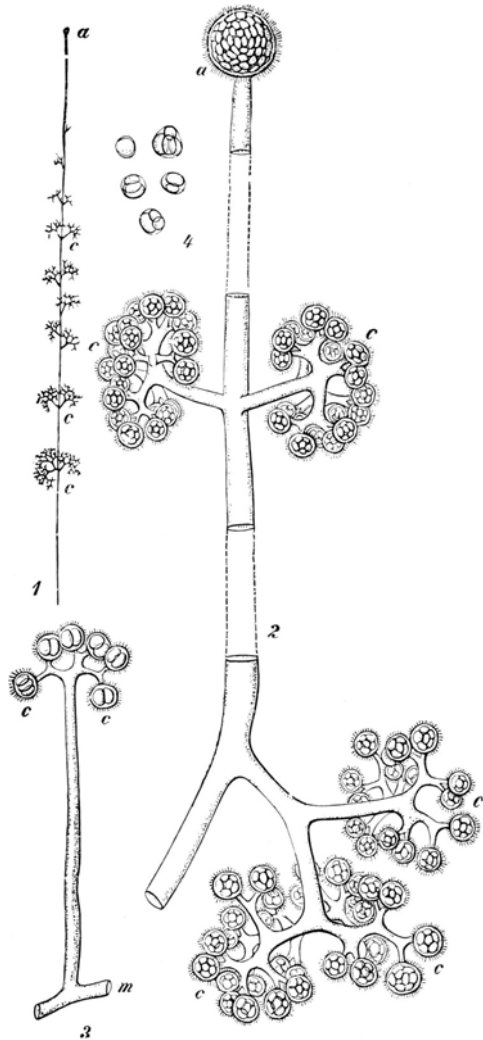


Abb. 82. *Thamnidium elegans* Link. 1. Sporangienträger, schwach vergrößert (6). 2. Drei Stücke davon stärker vergrößert (120); a scheidelständiges Sporangium, c Sporangiolen. 3. Verkümmertes Fruchtträger, der nur Sporangiolen trägt (200). 4. Abgelöste Sporangiolen (200). (Nach BREFELD.)

Sporangienträger cymös verzweigt. Sporangien meist  $80\mu$  dick, gelbgrau, durchsichtig, Wandungen glatt. Sporen  $5-10:2,5\mu$ , Columella  $40\mu$  dick. Zygosporen, Azygosporen, Gemmen, Kugeln und Kugelhefe bekannt.

Von Mucorarten mit sympodial verzweigten Sporangienträgern seien hier nur die exotischen Arten *Mucor Rouxii* (Calm.) WEHMER und *Mucor javanicus* WEHMER erwähnt, von denen der erstere Stärke verzuckert und manche Zuckerarten zu Alkohol vergärt, der letztere nur Zucker vergärt.

**Rhizopus nigricans** EHRENBERG (*Mucor stolonifer* EHRENBERG, Abb. 74, 79 und 80), auf Vegetabilien eine der gemeinsten Schimmelformen, bildet spinnwebartige, anfangs weiße Überzüge, die auch an den Gefäßwänden emporklettern. Er ist auch ein Erreger der Fäulnis der Früchte. Sporangienträger 0,5—4 mm hoch, meist an den Spitzen der durch Berührung mit festen Gegenständen gereizten Stolonen büschelig in Gruppen von 2—6, an deren Basis gleichzeitig eine reichliche Rhizoidenentwicklung eintritt. Seltener an der Spitze aufrechter, nicht gereizter, etwa 1 cm hoher Stolonen einzeln oder zu mehreren. Sporangien 100—300  $\mu$  dick, zuerst schneeweiß, dann schwarz. Columella der Apophyse breit aufsitzend, sinkt nach Auflösung des Sporangiums regenschirmartig zusammen. Sporen länglichrund, eckig. Größe sehr verschieden angegeben, 6—17  $\mu$  (FISCHER), 8—10  $\mu$  (WEHMER). Zygosporien kugelig, braunschwarz warzig 160—220  $\mu$  dick. Alle Zellwände des Pilzes neigen im Alter zu mehr oder minder starker Braunfärbung.

Die Gattung *Rhizopus* umfaßt ferner einige hier nicht weiter zu behandelnde technisch wichtige exotische Arten, die Stärke verzuckern und Zucker zu Alkohol vergären.

**Phycomyces nitens** (Agardh.) KUNZE (Abb. 81) lebt auf Ölkuchen, Brot hoch und anderem und ist an den außerordentlich hohen (bis 30 cm) metallglänzenden, olivfarbenen Sporangienträgern leicht zu erkennen. Sporangienträger unverzweigt 7—30 cm hoch, 50—150  $\mu$  dick; Sporangium kugelig 0,05 bis 1 mm dick, schwarz, feinstachelig. Columella breit, birnförmig oder gewölbt zylindrisch, glatt, bis 330:180  $\mu$ . Sporen elliptisch, oft abgeflacht, glatt, 16—39:8—15  $\mu$  gelblich, in Massen orangefarben. Zygosporien an der Substratoberfläche, schwarz, kugelig, bis 500  $\mu$  dick. Ihre Suspensoren mit zahlreichen dunklen, wiederholt gablig geteilten Dornen. Gemmen beobachtet.

**Thamnidium elegans** LINK (Abb. 82) wächst auf Vegetabilien in hellen, zarten, mucorähnlichen Rasen. Sporangienträger 1 bis mehrere Zentimeter hoch, wirtelig verzweigt, trägt am Ende ein vielsporiges Hauptsporangium mit Columella, an den Seitenästen kleinere, wenigsporige Nebensporangien (Sporangiolen) ohne Columella. Endsporangium kugelig, weiße Columella zylindrisch oder birnförmig. Sporen ellipsoidisch 8—10:6—8  $\mu$ . Sporangiolen auf mehrfach dichotom verästelten Seitenzweigen, entweder nur eine kugelige, 5—6  $\mu$  dicke, oder mehrere ellipsoidische kleinere Sporen enthaltend. Zygosporien mit dickem schwarzem, flach warzigem Exospor, gelblichem Endospor.

## II. Klasse: *Mycomycetes*, *Scheitelpilze*.

Mycelfäden septiert, Wachstum mit Scheitelzelle.

### 3. Unterklasse: *Ascomycetes*.

Hauptfruktifikation in Schläuchen (Asci). Als Nebenfruchtform tritt Conidienfruktifikation verschiedener Art auf.

A. Schläuche ganz unverhüllt.

a) Schläuche noch ohne den typischen Charakter, etwas unregelmäßig in Form und Sporenzahl: 1. Reihe: *Haemiascinae*.

b) Schläuche typisch, regelmäßig, einzeln oder in nackten Lagern: 2. Reihe: *Exoascinae*.

B. Schläuche mit irgendwelcher Umhüllung, daher Fruchtkomplexe, Schlauchfrüchte bildend.

a) Schläuche im ganzen Fruchtkörper an beliebiger Stelle als seitliche Zweige der Hyphen entstehend. Umhüllung locker fädig oder fast geschlossen. 3. Reihe: *Plectascinae*.

b) Schläuche nur am Grunde des geschlossenen Fruchtkörpers (*Perithecium*) an bestimmten Stellen entstehend. Umhüllung des Fruchtkörpers mehr oder minder kugelig, fest. 4. Reihe: *Pyrenomyces*.



c) Schläuche am Grunde des zuletzt weit offenen Fruchtkörpers (Apothecium) oder in einer flachen Schicht von vornherein offen liegend oder Kammern bei unterirdischen Fruchtkörpern auskleidend. 5. Reihe: *Discomycetes*.

Von den Ascomyceten kommen viele Arten und Formen in Lebensmitteln vor. Im nachstehenden sollen nur die allgemeiner verbreiteten besprochen werden, während die an besondere Lebensmittel angepaßten Arten im speziellen Teil des Handbuches Berücksichtigung finden.

Die Haemiascineae haben für die Lebensmittelbiologie keine Bedeutung. Dagegen interessieren aus der Reihe der Exoascineae hauptsächlich die Saccharomycetaceen, einige Vertreter der Endomycetaceen und aus der Familie der Exoascaceen die Art *Taphrina pruni*, die Deformationen der Früchte (Narrentaschen) bei *Prunus domestica* verursacht.

Die Saccharomycetaceen sind Sproßpilze mit Endosporen- und reichlicher Hefenzellbildung. Die Sporenbildung erfolgt im Innern einer Zelle nach vorheriger Kopulation mit einer anderen Zelle oder ohne eine solche. Jede

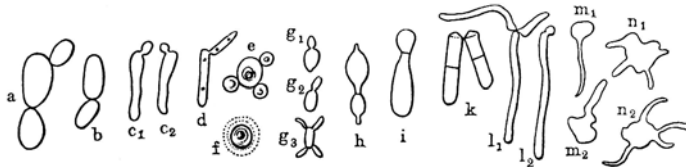


Abb. 83. Die wichtigsten Zellformen der Hefen.

(Aus P. LINDNER: Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 6. Aufl. Berlin 1930.)

Zelle kann als Sporenmutterzelle auftreten. Sporen einzellig, gewöhnlich zu 1—4 in jeder Mutterzelle, selten bis 12.

Die Gattungen lassen sich nur unterscheiden, wenn man ihre Sporenbildung kennt, die meist erst bei besonderer Kultur (vgl. S. 1603) erfolgt.

Die wichtigste Gattung ist *Saccharomyces*, bei deren Arten zahlreiche Rassen unterschieden werden, die durch bestimmte Gärungsprozesse charakterisiert sind.

Obwohl die Zellformen bei jeder Hefe variieren können, so kommen doch gewisse Formen bei einer Art häufig, bei der anderen weniger häufig oder nur ausnahmsweise vor. Daher haben sich in der praktischen Gärungsbakteriologie für gewisse Zellformen bestimmte Bezeichnungen eingebürgert. LINDNER sagt über die wichtigsten Formen folgendes:

„Für die Kulturhefe ist die eiförmige Zelle als typisch anzusehen (Abb. 83, *a*), für Weinhefe die elliptische (*b*); die Nachgärungshefen haben zumeist elliptische und pastoriane Formen (*b*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>); die Kahlhefen zeigen die Wegweiserform (*d*) häufig. Die Torulaarten besitzen fast nur sehr kleine Zellen (*g*<sub>1</sub>—*g*<sub>3</sub>). Die citronenförmigen Zellen (*h*) sind für *Sacch. apiculatus* typisch, die flaschen- oder kegelförmigen (*i*) für *Sacch. Ludwigii*, die oidiumartigen (*k*) für *Schizosacch. Pombe* und *octosporus*; die mycelialen (*l*<sub>1</sub> und *l*<sub>2</sub>) für gewisse Arten, die eine Mittelstellung zwischen Kahl- und Schimmelpilzen einnehmen; die amöboiden Zellen (*m*<sub>1</sub>*m*<sub>2</sub> und *n*<sub>1</sub>*n*<sub>2</sub>) treffen wir bei roten Hefen, sowie unter bestimmten Verhältnissen auch bei einigen Kulturhefen an.“

Mit KOHL kann man die Hefepilze in 3 Abteilungen bringen, nämlich in Sproßhefen (*Saccharomyceten*), Spaltheften (*Schizosaccharomyceten*<sup>1</sup> und

<sup>1</sup> Da von den Spaltheften bisher nur eine Gattung (*Schizosaccharomyces*) bekannt ist, wird diese vielfach als besondere Gattung der *Saccharomyceten* geführt (vgl. JANKE, MIGULA u. a.).

hefeähnliche Pilze. Die 3. Abteilung ergibt sich jedoch nicht aus der natürlichen Verwandtschaft der hier in Betracht kommenden Arten, sondern aus praktischen Gesichtspunkten.

**I. Saccharomycetes (Sproßhefen).** Die Vermehrung erfolgt durch Sprossung, außerdem durch Endosporenbildung. Jede Zelle kann als Sporenmutterzelle (Ascus) auftreten. Sporen einzellig, gewöhnlich zu 1—4, selten bis 12 in einer Mutterzelle enthalten. Typisches Mycel nur bei wenigen Arten vorkommend.

1. Gruppe: Die Zellen bilden in zuckerhaltigen Flüssigkeiten sogleich Bodensatzhefe, und, wenn überhaupt, erst spät eine Kahmhaut von mehr schleimiger Beschaffenheit ohne Luftenlagerung. Sporen rund oder oval mit glatter, einfacher oder doppelter Haut. Keimung durch Sprossung oder unter Bildung eines Keimschlauches (Promycels). Die meisten Arten rufen Alkoholgärung hervor.

1. Gattung: *Saccharomyces* RESS. Die mit einfacher Membran versehenen Sporen keimen durch Sprossung. In den Hautbildungen kommen bei einzelnen Arten auch Mycele mit deutlichen Querwänden vor. Von wichtigen Arten seien genannt: *S. cerevisiae* HANSEN mit runden bis ovalen Zellformen als typische Wuchsgestalt — hierzu gehört eine große Anzahl von Industriehefen —, *S. pastorianus* HANSEN eine untergärrige gefährliche Krankheitshefe mit mehr oder weniger wurstförmigen Zellen, *S. ellipsoideus* HANSEN mit vorwiegend elliptischen Zellen.

2. Gattung: *Hansenia* LINDNER. Charakter im allgemeinen wie bei *Saccharomyces*, jedoch mit ausgesprochen citronenförmigen Zellen. *Hansenia apiculata* (Rees) LINDNER (*Klöckeria apiculata* JANKE, *Saccharomyces apiculatus* HANSEN). „Apiculatus-Hefe“ ist in der Natur weit verbreitet und kommt z. B. auf Beerenfrüchten vor. Vgl. auch unter „Wein“.

3. Gattung: *Torulaspora* LINDNER. Zellen kugelig, torulaartig, mit einem großen Fetttropfen in der Mitte.

4. Gattung: *Zygosaccharomyces* BARKER. Von *Saccharomyces* dadurch unterschieden, daß vor der Sporenbildung eine Kopulation zweier Zellen eintritt.

5. Gattung: *Saccharomycodes* HANSEN. Die mit einfacher Membran versehenen Sporen keimen mit einem Promycel, von dem weitere Vermehrung durch Sprossung mit unvollkommener Abschnürung erfolgt. Mycelbildung mit deutlichen Querwänden.

6. Gattung: *Saccharomycopsis* SCHÖNNING. Sporen mit zwei Membranen, im übrigen der vorhergehenden ähnlich.

2. Gruppe: Die Zellen bilden in zuckerhaltigen Nährflüssigkeiten sofort eine Kahmhaut, die infolge Luftenlagerung trocken und matt aussieht. Sporen verschieden geformt, einfach behäutet, zum Teil mit einer hervorspringenden Leiste versehen, im übrigen glatt. Keimung durch Sprossung. Die meisten Arten sind durch ihre Esterbildung ausgezeichnet, einige rufen keine alkoholische Gärung hervor.

7. Gattung: *Pichia* HANSEN. Sporen rund, halbkugelig oder unregelmäßig und eckig; keine alkoholische Gärung; Mycelbildung.

8. Gattung: *Willia* HANSEN. Sporen hut- oder citronenförmig mit hervortretender Leiste. Die meisten Arten sind sehr wirksame Esterbildner, einige vermögen keine alkoholische Gärung hervorzurufen.

**II. Schizosaccharomycetes (Spalthefen).** Vermehrung nicht durch Sprossung, sondern durch Ausbildung einer Querwand (Abb. 83, *k*), wie bei den Bakterien. Jede vegetative Zelle kann zur Sporenmutterzelle (Ascus) werden; oft tritt zwar Verschmelzung zweier Zellen ein. Durch diese Kopulation entstehen die für die Schizosaccharomyceten charakteristischen Hantel- und Bisquitformen.

Als wichtigste Art sei *Schizosaccharomyces Pombe* LINDNER genannt, aus dem Hirsebie der Neger abgeschrieben, von LINDNER aber auch in einer Essigmutter aufgefunden (neben *Bacterium xylinum*). Wegen ihrer kräftigen Alkoholbildung wird die Art in Südamerika in Brennereien verwendet.

**III. Saccharomycetenähnliche Pilze.** Zu dieser Gruppe lassen sich die hefeähnlichen und den Saccharomyceten nahestehenden Gattungen vereinigen, von denen einige höchstwahrscheinlich unmittelbar von den Saccharomyceten abstammen. In Betracht kommen hauptsächlich die Gattungen *Mycoderma*, *Torula*, *Monilia*, *Oidium* (*Oospora*) und *Dematium*, die in der Regel zu den Fungi imperfecti gerechnet werden.

Hefencharakter haben insbesondere *Mycoderma* und *Torula*<sup>1</sup>, weshalb sie hier anschließend kurz behandelt seien.

### Mycoderma.

Die *Mycoderma*hefen sind sehr luftliebend. Sie wachsen daher an der Oberfläche der Nährflüssigkeiten, wo sie rasch dichte lufthaltige Decken (Kahmhäute) bilden, weshalb man sie auch Kahmhefen nennt. Die Gestalt der Zellen ist vorwiegend gestreckt, aber sehr variabel (Abb. 84a und b; vgl. auch Abb. 48, 5). Sporenbildung fehlt, ebenso die Fähigkeit, Zucker zu Alkohol zu vergären. Zur Unterscheidung der Arten müssen neben den morphologischen auch physiologische Merkmale herangezogen werden. Die *Mycoderma*hefen sind zum Teil gefährliche Schädlinge, weil sie Alkohol verbrennen und organische Säuren verzehren. Dadurch fallen die Gärprodukte, auf denen sie sich ansiedeln (Wein, Bier, gesäuerte Gemüse), leicht der Fäulnis anheim. Die bekanntesten Arten (bzw. Sammelspezies) sind *M. cerevisiae* Desm., ein Schädling, der dem Bier einen unangenehmen Geruch und Geschmack verleiht und *M. vini* Desm., ein gefürchteter Weinschädling.

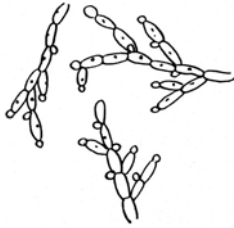


Abb. 84a. *Mycoderma* aus westpreußischem Heidelbeerwein (540:1). Pastoriane Form der Zellen.



Abb. 84b. *Mycoderma* aus Rudesheimer Wein (540:1). Unregelmäßige Zellformen.

*M. cucumerina* ADERHOLD ruft die Kahmhautbildung auf der Brühe saurer Gurken hervor.

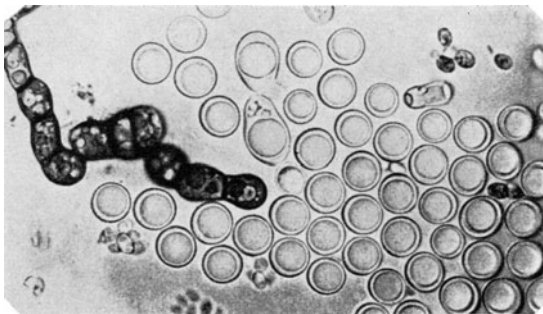


Abb. 85. *Torula pulcherrima* (mit großen Fetttropfen) und Fadenstück von *Dematium pullulans*. Von dem klebrigen Belag einer Weinbeere. Adhäsionskultur. Vergr. 1:600. (Aus P. LINDNER: Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, 5. Aufl. Berlin: Paul Parey 1909.)

entwickeln sich in Nahrungsmitteln sehr häufig, oftmals recht unerwünschte Veränderungen hervorrufend, wie z. B. unangenehme Geruchs- und Geschmacksstoffe oder Schleimbildung in den Gärprodukten. Die weißlichen Beschläge auf Wurstdauerwaren bestehen fast ausschließlich aus *Torulaceen*. *Torula*hefen, die rote Farbstoffe bilden, sog. Rosahefen, treten auf Plattenkulturen oft als Verunreinigungen auf.

### Torula<sup>2</sup>.

Als *Torula*hefen bezeichnet man in der technischen Mykologie hefeartige Organismen mit Sproßmycel aus runden oder ovalen Zellen (vgl. Abb. 48, 3 u. 4, mit oder ohne Gärvermögen, jedoch ohne die Fähigkeit, endogene Sporen zu bilden).

Die sog. „*Torulaceen*“ sind allgemein verbreitet und

<sup>1</sup> MIGULA (Kryptogamenflora, Bd. 3, Pilze, 3. Teil, 1. Abt.) stellt beide Gattungen aus diesem Grunde zu den Saccharomyceten, obwohl Sporenbildung bisher nicht beobachtet wurde.

<sup>2</sup> Vgl. WILL: In LAFAR: Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4.

Die zahlreichen Formen sind meist nicht genügend systematisch charakterisiert. WILL<sup>1</sup> hat späterhin die von ihm beschriebenen und zu den Torulaceen gerechneten Organismen in zwei Gruppen mit den Gattungen Eutorula, Torula<sup>2</sup> und Mycotorula eingeteilt.

Erwähnt sei hier *Eutorula pulcherrima* (LINDNER) WILL, die auf Weintrauben und Pflaumen gefunden wurde, und zuweilen in Fruchtzubereitungen angetroffen wird. Die Zellen enthalten große Fettkugeln (Abb. 85).

Von den Endomycetaceen wird eine Art, die die Kreidekrankheit des Brotes verursacht (*Endomyces fibuliger*), im Kapitel über Backwaren behandelt werden.

#### Plectascineae.

Von größerer allgemeiner Bedeutung ist die in die Reihe der Plectascineae gehörende Gruppe der Aspergillaceen, zu denen eine größere Zahl der häufigst vorkommenden Schimmelpilze gehört und die daher hier eingehender besprochen werden muß.

ED. FISCHER gliedert die Aspergillaceae<sup>3</sup> in 12 Gattungen, von denen uns hier aber nur drei, nämlich *Aspergillus*, *Penicillium* und *Citromyces* (neuerdings von einigen Autoren als Untergattung von *Penicillium* angesehen) interessieren. Die Unterscheidung derselben erfolgt durch den Bau der Conidienträger; die Ascusfruktifikation ist bei den meisten Spezies noch nichtbekannt. Über die morphologischen Merkmale der genannten Gattungen ist folgendes zu sagen:

1. *Aspergillus* (MICH.) CORDA (die Gattungen *Eurotium* LINK und *Sterigmatocystis* CRAMER werden in diese jetzt meist eingeschlossen). Der Conidienträger ist eine aufrechte, derbe Hyphe, 0,2—4 mm hoch, meist unverzweigt und unseptiert; das Ende ist keulig bis kugelig angeschwollen („Blase“). Die Blase trägt einfache (*Aspergillus*) oder verzweigte (*Sterigmatocystis*) kurze Sterigmen, die die Blase unregelmäßig bedecken und an denen die Conidienketten entspringen. Schlauchfrüchte („Perithezien“) sind nur von wenigen Arten bekannt, für die auch die Gattungsbezeichnung *Eurotium* gebräuchlich ist. Die Schlauchfrüchte sind kleine kugelige, lebhaft gefärbte Kapseln, mit zarter einschichtiger oder derber mehrschichtiger Rinde, entweder nackt oder von einer besonderen Hülle („Blasenhülle“) umgeben. Die aseptigen Asci werden entweder sofort oder nach kurzer Ruhepause entwickelt. Die Entwicklung der Früchte erfolgt aus einer oder zwei besonderen oder durch Verwachsung zahlreicher gewöhnlicher Hyphen. Die Conidienrasen sind grün, gelb, rötlichbraun, schwarzbraun, weiß.

2. *Penicillium* LINK. Der Conidienträger ist eine zarte, septierte, vielzellige, gegen die Spitze alternierend oder wirtelig verzweigte Hyphe, ohne Blase, stets unter 1 mm hoch.

An den Enden der Träger finden sich in büschelförmiger Anordnung einfache Sterigmen, an denen die Conidienketten entstehen. Die Schlauchfrüchte sind zart oder derb, mit oder ohne Hülle, mit kontinuierlicher Entwicklung oder Ruheperiode, oder auch steril; sie entstehen gewöhnlich wohl aus der Verwachsung gleichartiger Hyphen. Die Conidienrasen sind meist grün, seltener weiß, rötlich, bräunlichgelb, braun.

<sup>1</sup> WILL: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1916, 46, 226f.

<sup>2</sup> JANKE (Allgemeine technische Mikrobiologie, S. 244—246) führt hierfür die Gattungen *Eutorulopsis* und *Torulopsis* ein, da die Bezeichnung „*Torula*“ im Sinne HANSENS aus Prioritätsgründen zu streichen ist.

<sup>3</sup> Eine sehr eingehende Darstellung der Aspergillaceen gibt WEHMER in LAFAR: Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4. Über neuere Systematik der Aspergillaceen und Bearbeitung der Gattung *Aspergillus* vgl. A. BLOCHWITZ: Ann. mycologici 1929, 27, 185 bis 240.

3. *Citromyces* WEHMER. Zarte, zumeist unverzweigte, am Ende nicht oder wenig angeschwollene Conidienträger, die direkt ein Sterigmenbüschel tragen, normal nicht septiert. Die Conidien sind an den einfachen, wirtelig um die Spitze des Trägers aufwärts gebogenen Sterigmen in langen Ketten angeordnet. Conidienrasen grün. Schlauchfrüchte nur bei einer Art bekannt.

Für die Speziesunterscheidung hat man nach WEHMER bei den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* zu berücksichtigen: die Farbe der jungen Pilzdecken, Größe und Aufbau des Conidienträgers, Gestalt und Größe der Conidien, auch physiologische Merkmale, wie Ernährungs- und Temperatursprüche (*Optimum*), Wachstumsenergie, Enzyymbildung, natürlich auch die etwaige Bildung von Ascusfrüchten.

### Gattung *Aspergillus*.

#### a) *Aspergillus*-Arten mit unverzweigten Sterigmen.

*Aspergillus glaucus* LINK (*Eurotium Aspergillus glaucus* DE BARY, *Eurotium herbariorum* LINK, *Eurotium repens*) ist einer der häufigsten in grünen Rasen

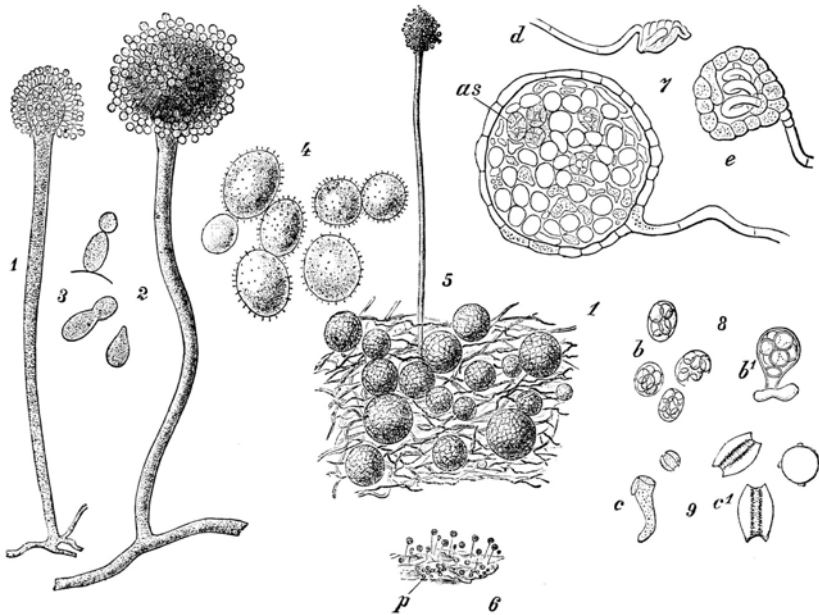


Abb. 86. *Aspergillus glaucus* (1. und 2. 50:1; 5. 30:1; 7. 170:1; 8. 250:1; 9. c<sup>1</sup> 700:1). 1. und 2. Conidienträger; 3. Sterigmen; 4. Conidien; in 5. ein Stück Myceldecke mit aufliegenden Perithezien und einem Conidienträger; bei 6. dasselbe in ungefähr natürlicher Größe (*p* Perithezien); 7. Perithezienquerschnitt mit jungen Ascis (*as*) und erste Entwicklungsstadien (*d* und *e* *Eurotium*-Schraube, die schraubig gewundene askogene Hyphe); 8. isolierte Ascis; 9. freilegende Sporen, bei *c* keimend. (1., 7., 8., 9. (z. T.) nach DE BARY, das übrige nach WEHMER.)

auf Brot, eingemachten Früchten usw. wachsenden Schimmelpilze (Abb. 86). Die anfangs hellgrünen bis spangrünen Rasen werden später graugrün bis graubraun, gleichzeitig färbt sich das Mycel hellgelb bis rostbraun. Wachstums-*optimum* bei etwa 25°.

Conidienträger 1—2 mm hoch. Blase nicht scharf vom Stiel abgesetzt, kugelig bis kolbig, etwa 60  $\mu$  im Durchmesser, mit unverzweigten, sehr kurzen, gedrunghenen Sterigmen (bis 14:7  $\mu$ ) allseitig besetzt. Conidien feinstachelig, 7—10  $\mu$  im Durchmesser, kugelig oder schwach gestreckt. Schlauchfrüchte

(„Perithechien“) zahlreich, erst citronengelbe, später braune Kapseln von 100 bis 250  $\mu$  Durchmesser, mit zarter, einschichtiger Wandung und zahlreichen kugelig-ovalen Asci. Jeder Ascus enthält 5—8 farblose ellipsoide Sporen mit Längsfurche, 7—10  $\mu$  lang, 5—8  $\mu$  breit.

*Aspergillus flavus* LINK (Abb. 87). Bildet gelbgrüne, in älteren Kulturen olivbraune Decken. Hat zum Unterschied von *A. glaucus* das Wachstums-optimum bei 37°. Kommt seltener als *A. glaucus*, aber doch häufig auf allen möglichen Substraten, z. B. auf Futtermitteln vor. Blase kugelig bis keulig. 10—30 oder 40  $\mu$  im Durchmesser, selten scharf vom hellen warzigen Stiele



Abb. 87.

Abb. 88.

Abb. 87. *Aspergillus flavus* Link (1.—4. 140:1; 5. 400:1; 6. 1000:1; 7. 1000:1). 1.—4. Conidienträger mit kugelliger bis keuliger Blase und unverzweigten Sterigmen; 5. die Außenwand des oft septierten Stieles durch farblose Körnchen rau; 6. Conidienrasen (etwa 2:1); 7. Conidien. (Nach WEHMER.)

Abb. 88. *Aspergillus fumigatus* Fresenius (1., 2. und 5. 140:1; 3. 1000:1; 4. a 70:1; 4. b 719:1; 4. c und 4. d 2250:1). 1. und 2. keulige Conidienträger (bei 1. im optischen Durchschnitt. 3. Conidien; 4. Ascus und Ascosporen; a s Asci; b isolierter Ascus; c, d Sporen mit Hautrand von oben (c) und von der Seite (d) gesehen. 5. Eigenartig blasig angeschwollene Hyphen (bl) neben Conidienträgern aus einer Decke. (4. a—d nach GRJNS, das übrige nach WEHMER.)

abgesetzt, unverzweigte oder verzweigte schlanke Sterigmen (20:6), große, meist unregelmäßige, kugelige bis birnförmige glatte, seltener feinkörnige Conidien von 5—6  $\mu$  Durchmesser. Kleine, knollige, schwarze Sklerotien, die steril bleiben.

Nahe verwandt mit dieser Art sind die exotischen *A. oryzae* und *A. Wentii*.

*Aspergillus oryzae* (AHLB.) COHN spielt bei der Herstellung des japanischen Reisbieres eine Rolle. Der neben zahlreichen anderen Fermenten auch ein diastatisches Ferment erzeugende Pilz wird für bestimmte Zwecke der Lebensmittelindustrie auf Kleie kultiviert, jetzt auch bei uns in den Handel gebracht (Protozyme und ähnliche Präparate, die z. B. als Klärungsenzym Verwendung finden).

Der nahe verwandte *Aspergillus Wentii* WEHMER wird in Ostasien neben *A. oryzae* für die Sojabereitung benutzt.

*Aspergillus fumigatus* FRESENIUS (Abb. 88), ebenfalls eine Art mit hohem Wachstumsoptimum ( $37-40^{\circ}$ ). Daher wie *A. flavus* auch pathogen. Zuweilen auch auf Pflanzenteilen und Gebrauchsgegenständen. Grüne bis graugrüne Rasen, bald grau oder braun werdend. Conidienträger klein ( $0,1-0,3$  mm hoch), mit keuliger Blase ( $10-20 \mu$  dick), kuppenständigen, schlanken, einfachen Sterigmen  $6-15 \mu$  und sehr kleinen ( $2-3 \mu$  im Durchmesser) kugeligen Conidien. Schlauchfrüchte mit Blasenhülle.

*Aspergillus clavatus* DESMANÈRES (Abb. 89). Bildet auf Vegetabilien grüne bis bläulich-grüne Decken. Blase anfangs langgestreckt ( $150:35 \mu$ ), später der

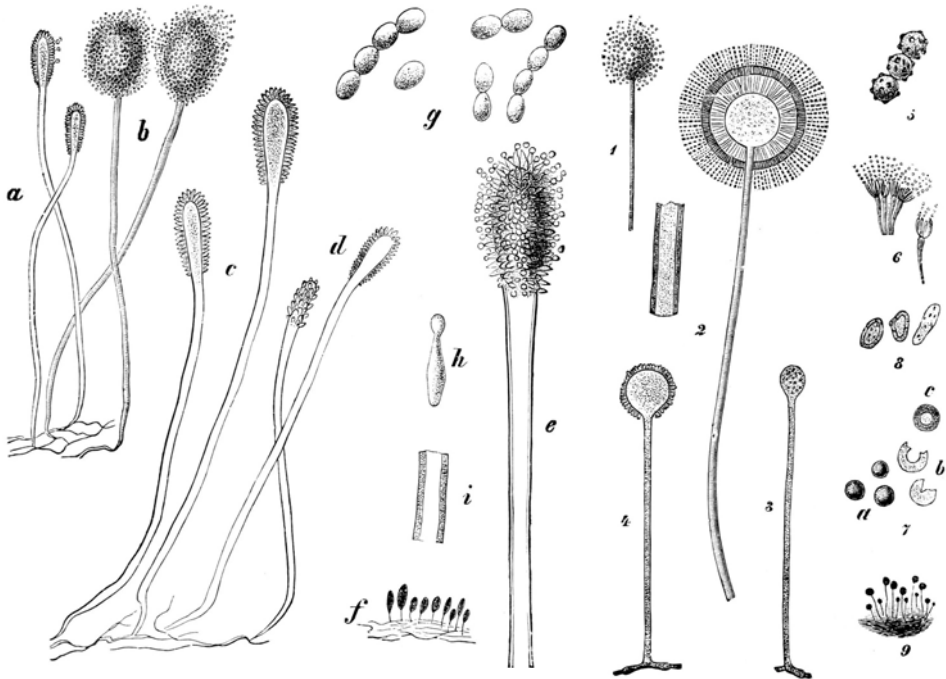


Abb. 89.

Abb. 90.

Abb. 89. *Aspergillus clavatus* (a und b  $30:1$ ; c und d  $60:1$ ; e  $120:1$ ; g und h  $1000:1$ ). a, b, c, d, e Conidienträger in verschiedenen Entwicklungsstadien mit langkeuliger Blase und einfachen Sterigmen, bei e im optischen Durchschnitt, bei e' Beginn der Conidienbildung; f schwach vergrößerter Rasen; g Conidien; h Sterigma; i Stieldurchschnitt. (Nach WEHMER.)

Abb. 90. *Aspergillus niger* (1.-4.  $40:1$ ; 5.  $1000:1$ ; 6.  $154:1$ ; 7. natürl. Größe; 9.  $2:1$ ). 1. und 2. Conidienträger (bei 2. optischer Durchschnitt, halb schematisch); 3. und 4. junge Träger vor und bei beginnender Sterigmenbildung; 5. Conidien; 6. Sterigmen; 7. Sklerotien, nach resultatlosem Keimversuch (bei b) zerfallen; 8. derbrandige getüpfelte Zellen des zerfallenen Sklerotieninnern; 9. Conidienrasen. (Nach WEHMER.)

Kugelform sich nähernd. Sterigmen einfach kegelförmig ( $8:3 \mu$ ), Conidien in langen Ketten, oval, glatt ( $3-4,5:3 \mu$ ).

#### b) *Aspergillus*-Arten mit verzweigten Sterigmen.

*Aspergillus niger* VAN TIEGHEM (*Sterigmatocystis antacustica* CRAMER, *St. nigra*) (Abb. 90). Kennlich an den braunschwarzen Rasen mit einige Millimeter hohen starren Trägern. Blase kugelig, vom Träger scharf abgesetzt (etwa  $80 \mu$  im Durchmesser), schlanke primäre Sterigmen ( $26:4,5 \mu$ ) mit je 3-4 sekundären Sterigmen ( $8:3 \mu$ ), Conidien dunkel, kugelig, glatt bis warzig ( $3-4 \mu$  im Durchmesser). Gelbliche Sklerotien immer ohne Ascusentwicklung.

Auf sauren Substraten (Gerbsäurelösungen, Fruchtsäurelösungen) häufig; produziert auf tanninhaltigen Nährböden ein das Tannin in Gallussäure und Glucose spaltendes Enzym (Tannase); verursacht unter anderem auch den „Pfropfengeschmack“ am Kork.

*Aspergillus candidus* PERS. wächst auf verdorbenen Vegetabilien verschiedenster Art in weißen, später gelblichen bis bräunlich verfärbten Decken.

Conidienträger nach WEHMER (*A. candidus* I WEHMER) in zwei Formen. Die eine entspricht im Aufbau der des *A. niger*, die andere ist einfacher gebaut, hat unverzweigte Sterigmen und ist kleiner. Wachstumsoptimum 20—24°. Conidien nicht ellipsoidisch.

Eine als *Aspergillus albus* bezeichnete Art kommt nach LINDNER regelmäßig auf dem von der Kornmotte befallenen Getreide vor.

Gattung *Penicillium*  
(Pinselschimmel).

*Penicillium glaucum*  
(LINK) BREFELD (*P. crustaceum* FRIES?) (Abb. 91).  
Sammelname für zahlreiche, in grünen Rasen wachsende, sehr ähnliche, weit verbreitete Arten, die einer eingehenden Untersuchung noch harren. Bau des Conidienträgers, Maße der Conidien sind bei diesen Arten außerordentlich ähnlich. Was die einzelnen Autoren vor sich gehabt haben, ist nicht mehr festzustellen. Die Conidien-

größe schwankt zwischen 2—3,3,8—4,3  $\mu$ . Die Sporen benetzen sich schwer mit Wasser (Fettgehalt) und schwimmen als trockener Staub auf der Oberfläche wässriger Flüssigkeiten, während Alkohol sie sofort benetzt. Die von BREFELD beschriebene Art hat glatte kugelige Conidien, die in langen zusammenhängenden Ketten auf zugespitzten 8—13  $\mu$  langen, 3—4  $\mu$  dicken Sterigmen stehen. Conidienträger in der Verzweigung sehr variabel, 0,2—0,4 mm hoch, jeder Zweig mit einem Büschel (bis 12) Sterigmen besetzt, die gewöhnlich kürzer als ihre Tragzellen sind. Unter bestimmten Bedingungen entstehen Skleerotien, die nach einer Ruheperiode zur Ascusbildung schreiten.

THOM hat einige in Käsen gefundene Arten genauer beschrieben, die sich von *P. glaucum* BREFELD deutlich unterscheiden, so *P. roquefortii* THOM im Roquefortkäse und *P. Camemberti* im Camembert vorkommend.

*Penicillium luteum* ZUKAL (Abb. 92) wächst in grünen Decken auf Früchten, an denen es Fäule hervorruft, sowie auf anderen sauren Nährmedien. Die sterilen Mycelien sind oft an der leuchtend gelben Färbung kenntlich. Die Conidienträger zeigen Neigung zur Wirtelbildung. Die Sterigmen sind relativ

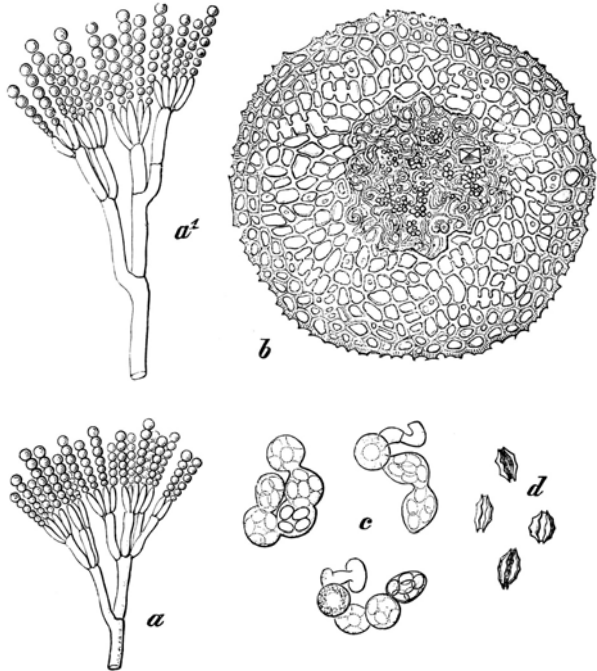


Abb. 91. *Penicillium glaucum* (a 315:1; b 150:1; c 630:1; d 800:1).

a, a' Conidienträger mit verschiedenartiger Verzweigung; b Ascusfrucht mit reifenden Ascis; c isolierte Ascis in Sporenbildung betroffen; d Sporen von der Seite gesehen. (Nach BREFELD.)



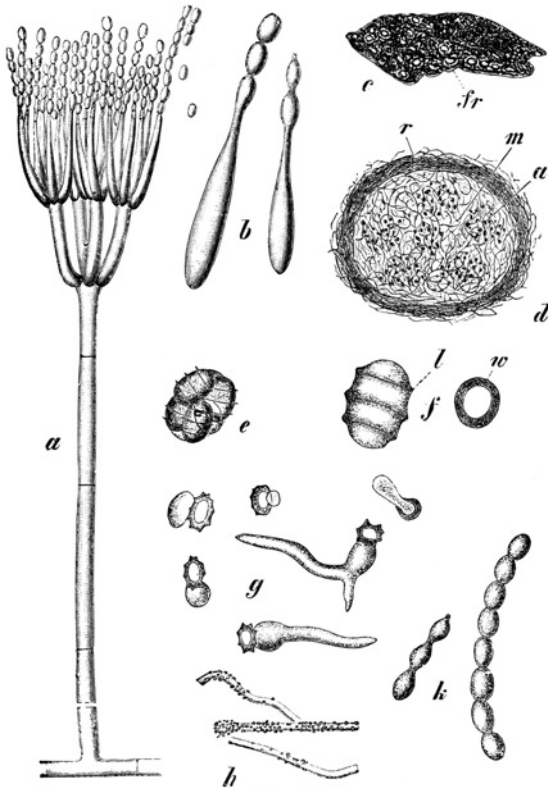


Abb. 92.

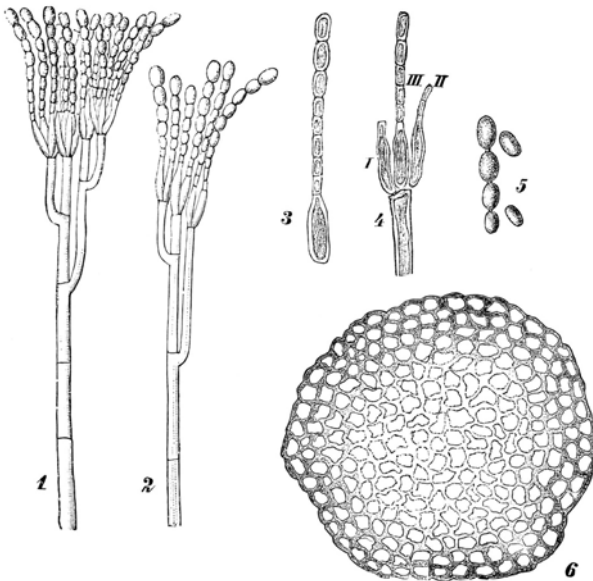


Abb. 93.

länger als bei anderen Arten, mehr zugespitzt, die kleinen Conidien deutlich gestreckt (2,3—3:1,4—2  $\mu$ ), glatt, zart, mattgrau, gehäuft bräunlich-grün. Häufig Koremienbildung; Ascusfrüchte häufig, citronengelbe bis goldgelbe, im Alter dunkel orangefarbene, schließlich mißfarbige, zarthäutige Gebilde (1—2 mm).

**Penicillium italicum** WEHMER (Abb. 93) kommt nur auf Südfrüchten in grünen, bläulich-grau getönten Decken vor. Es verursacht eine schnell um sich greifende Fäulnis dieser Früchte. Der Bau des Conidienträgers entspricht dem von *P. glaucum* BREFFELD. Nur sind die Conidien ellipsoidisch.

Die etwa 0,25 mm langen Träger zeigen 2—3 ungleich hoch angesetzte, aufrecht gerichtete Seitenzweige, die wie die Hauptzweige mit einem Sterigmenbüschel abschließen. Die ellipsoidischen Conidien hängen zunächst wie die Zellen einer dicht septierten Hyph e fest zusammen, runden sich aber später ab (4 bis 5:3  $\mu$ ). Der Pilz erzeugt kleine, braune, sterile Sklerotien.

**Penicillium olivaceum** WEHMER (*P. digitatum* SACC.) (Abb. 94) tritt wie die vorige

Abb. 92. *Penicillium luteum* (a 1000:1; b 2000:1; c 1200:1; f 2400:1; g 900:1; h 500:1; k 2000:1). a Typischer Conidienträger; b Sterigmen; k Conidien; c Ascusfrüchte auf der Pilzdecke (natürl. Größe); d eine solche im Querschnitt mit Mark (m), Rinde (r) und Ascusgruppen (a); e freier Ascus; f Sporen von der Seite und im Querschnitt mit tonnenbandartigen Leisten (l, w); g Ascosporenkeimung; h Hyphen mit gelben Körnchen. (Nach WEHMER.)

Abb. 93. *Penicillium italicum* (1. und 2. 400:1; 3. und 4. 600:1; 5. 700:1; 6. 90:1). 1. und 2. Conidienträger; 3. und 4. Sterigmen; 5. Conidien; 6. Querschnitt durch ein älteres Sklerotium, die gefärbten Rindenschichten stärker schattiert. (Nach WEHMER.)

Art auf faulenden Südfrüchten, zuweilen auch auf heimischem Obst auf Rasen braungrün. Keine bestimmte Verzweigung der Conidienträger. Conidien ellipsoidisch ( $6-7:4 \mu$ ). Eine Reihe anderer auf Südfrüchten vorkommender *Penicillium*arten ist von WEIDEMANN<sup>1</sup> beschrieben worden.

***Penicillium brevicaula* SACCARDO** (*Scopulariopsis brevicaula* BAINIER) (Abb. 95) ist auf moderigem Papier, altem Pferdedünger und in der Luft gefunden und zum Nachweis von Arsen empfohlen worden, weil es mit Spuren Arsen stark riechendes Diäthylarsin bildet. Bräunlich-gelbe bis braune Decken. Conidienträger zart und klein, unregelmäßig verzweigt mit spärlichen Ästen und ziemlich langen Sterigmen. Conidien nach STOLL in zwei Formen:

kugelig ( $6,5 \mu$  Durchmesser) oder birnförmig ( $10:6 \mu$ ). SACCARDO gibt kugelige warzige Conidien an. Nach WEHMER ist die Conidienform variabel, sowohl länglich, wie kugelig, glatt wie feinstachelig und warzig, bei typischer Ausbildung in gutem Nährsubstrat jedoch kugelig, warzig mit breitem Stielansatz ( $6,8-9,2:5,7$  bis  $6,8 \mu$ ). Wachstumsoptimum bei  $25-30^\circ$ . Nach HENNEBERG<sup>2</sup>,

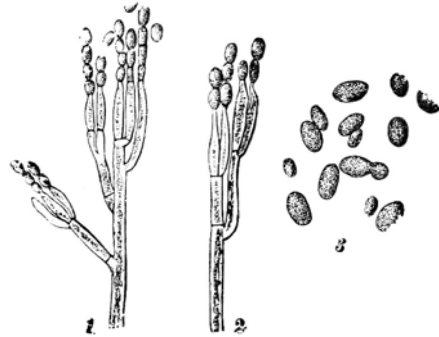


Abb. 94. *Penicillium olivaceum* (1. und 2. 400:1; 3. 500:1).  
1. und 2. Conidienträger; 3. Conidien.  
(Nach WEHMER.)

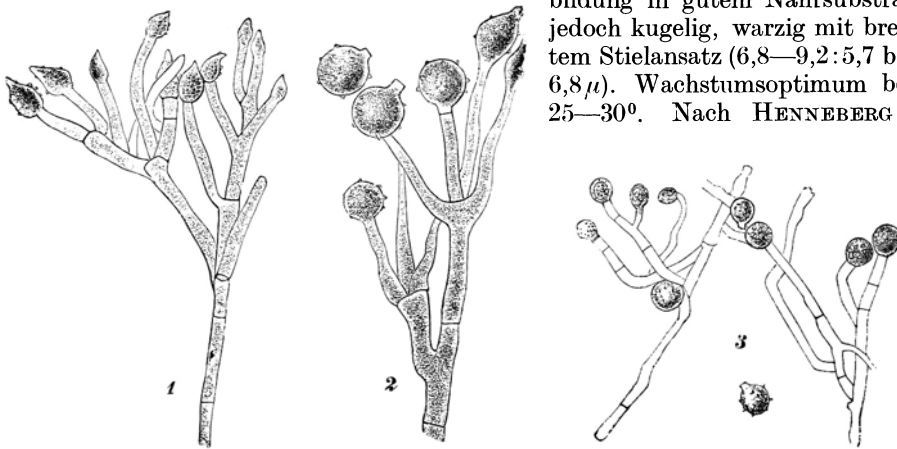


Abb. 95. *Penicillium brevicaula* (1. und 2. 500:1 bzw. 800:1; 3. 400:1).  
1. und 2. Conidienbildung an besonderen Trägern sowie direkt am Mycel (3), erstere von Würzgelatine, letzteres von Nähragar; Conidienträger 1 mit nur jüngeren gestreckten Conidien, 2. mit reifen und drei jüngeren Conidien. (Nach WEHMER.)

der *P. brevicaula* häufig auf der Oberfläche verschiedener Käsesorten festgestellt hat, handelt es sich um eine Gruppe sehr ähnlicher Arten oder Rassen.

### Gattung *Citromyces*.

Zur Gattung *Citromyces* (WEHMER) gehören einige Formen, von denen sich verschiedene physiologisch durch starke Vergärung von Zucker zu Citronensäure auszeichnen. Wachstumsoptimum ziemlich niedrig (etwa  $20^\circ$ ).

***Citromyces Pfefferianus* WEHMER** (Abb. 96) wächst auf sauren Früchten und Nährlösungen in grünen Schimmeldecken, die makroskopisch nicht von

<sup>1</sup> WEIDEMANN: Zentralbl. Bakteriologie. II. Abt., 1907, 19, 675.

<sup>2</sup> HENNEBERG u. KNIEFALL: Milchw. Forsch. 1932, 13, 520—529.

*Penicillium glaucum* zu unterscheiden sind. Conidienträger zart, kaum  $70\ \mu$  hoch, Blase  $4\text{--}8\ \mu$  dick; Sterigmen ( $9\text{--}14:3\ \mu$ ) quirlig angeordnet. Conidien kugelig ( $2,3\text{--}2,8\ \mu$  im Durchmesser).

Aus der Reihe der Plectascineae ist weiter die zu den Elaphomyceten gehörende Hirschtrüffel (*Elaphomyces cervinus* PERS.) zu erwähnen, die in gemahlenem Zustande hin und wieder Lebensmitteln als vermeintliches

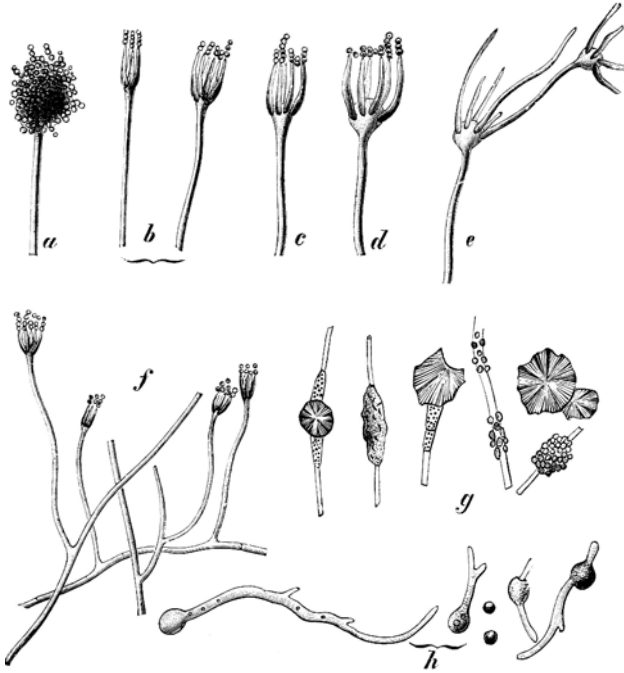


Abb. 96. *Citromyces Pfefferianus* (*a-e* 400:1; *f* 240:1; *g* 400:1; *h* 600:1). *a-f* Conidienträger; bei *b-d* nach Abpräparieren der Conidienmassen die variable Blase mit einfachen Sterigmen zeigend; *e* Mißbildung (ein zu einem neuen Träger auswachsendes Sterigma); bei *f* Conidienträger schwächer vergrößert; *g* Hyphen des Pilzes aus kalkhaltiger Nährlösung mit ansitzenden Calciumcitratbildungen; *h* reife und keimende Conidien. (Nach WEHMER.)

Aphrodisiacum zugesetzt wird. Sie ist ausgezeichnet durch kugelige, undurchsichtige, schwarze Sporen ( $28\text{--}32\ \mu$ ), deren Oberfläche uneben erscheint.

Zwei zu den Terfeziaceen gehörende Arten (*Choiromyces maeandri-formis* und *Terfezia leonis*) finden im Abschnitt „Speisepilze“ Erwähnung.

#### 4. Reihe: Pyrenomycetes.

Zu der großen Reihe der Pyrenomycetes gehören eine Anzahl auf Nahrungsmitteln lebende Pilze, die aber zum größten Teil bei den einzelnen Lebensmitteln besprochen werden sollen. LINDAU teilt die Pyrenomycetes folgendermaßen ein:

- I. Perithecium mehr oder weniger kugelig, geschlossen bleibend, schwarz.
  1. Unterreihe Perisporiineae.
- II. Perithecium mehr oder minder kugelig, oft schnabelartig ausgezogen, an der Spitze mit Loch sich öffnend
  - α) Perithecienwandung weich, hell gefärbt. Mit oder ohne Stroma. 2. Unterreihe Hypocreineae.

- β) Perithecienwandung sich vom Gewebe des Stromas nicht abhebend.  
 Asken mehrere in den Loculi. 3. Unterreihe Dothideineae.  
 Ascus einzeln und allein in jedem Loculus.  
 4. Unterreihe Pseudosphaeriineae.
- γ) Perithecienwandung stets typisch ausgebildet, schwarz, ledrig bis brüchig kohlig. Mit oder ohne Stroma. 5. Unterreihe Sphaeriineae.
- III. Perithecien länglich, strichförmig oder senkrecht abstehend, muschel- oder stäbchenförmig, sich am Scheitel mit Längsriß öffnend, schwarz.  
 6. Unterreihe Hysteriineae.

Von den Perisporiineae kommen hier einige Eri-sypheen in Betracht, wie z. B. *Uncinula necator* BURR., deren Conidienform *Oidium Tuckeri* am Weinstock den „echten Mehtau“ hervorruft. Von den Hypocreineae sind zu nennen die Gattungen *Fusarium* (vielfach Conidienfruchtform von *Nectria*-Arten, vgl. auch unter Fungi imperfecti) und *Claviceps* (vgl. unter Getreide), von den Sphaeriineae die Gattungen *Mycosphaerella*, *Pleospora*, *Leptosphaeria*, *Venturia* (über letztere siehe unter Obstkrankheiten). Von diesen sei hier nur die zu den häufigeren Schimmelpilzen gehörige Art *Mycosphaerella Tulasnei* noch beschrieben, während hinsichtlich der anderen auf die folgenden Bände des Werkes verwiesen werden muß.

***Mycosphaerella Tulasnei*** (Abb. 97 und 98) ist die Ascusform einer als *Cladosporium herbarum* LINK (Abb. 99) bezeichneten Conidienform. *Cladosporium* stellt zweifellos eine Sammelspezies verschiedener Arten dar, von denen eine zu *Mycosphaerella Tulasnei* gehört, während bei anderen die systematische Stellung verläufig zweifelhaft bleibt.

*Cladosporium* tritt, häufig mit *Alternaria* vergesellschaftet, auf pflanzlichen Stoffen in Form schwärzlicher Beläge auf, weshalb man diese Pilze auch als „Schwärzepilze“ bezeichnet (vgl. unter Getreide).

Auch auf Erbsen ist *Cladosporium* beobachtet worden. Ferner siedelt es sich auf Korken der Weinflaschen, im Käse, auf Kühlhausfleisch, in Eiern und auf Tomaten an und stiftet hier Schaden.

Das Mycel von *Cladosporium* ist olivgrün. Die Conidien werden an den Trägerhyphen akropetal abgeschnürt und vermehren sich dann durch Sprossung, so daß weit verzweigte sproßverbände entstehen. Die Größe der gewöhnlich eiförmigen Conidien schwankt zwischen 12—25:5—10  $\mu$ . Die Conidien sind ein-, zwei- oder dreizellig. Die Askosporen sind zweizellig.

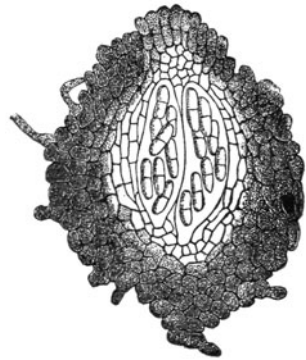


Abb. 97.  
*Mycosphaerella Tulasnei*  
 E. JANCZEWSKI (325:1).  
 Längsschnitt durch ein Perithecium. (Nach JANCZEWSKI.)



Abb. 98.  
*Mycosphaerella Tulasnei*  
 E. JANCZEWSKI (250:1).  
 Mycelfaden mit Conidien.  
 (Nach JANCZEWSKI.)

## 5. Reihe Discomycetes.

LINDAU teilt die Discomycetes folgendermaßen ein:

- I. Apothecien zuerst geschlossen, dann sich mehr oder weniger weit napfig oder schüsselförmig öffnend.
  1. Apothecien sich am Scheitel lappig öffnend, indem eine Deckhülle, die oft noch mit dem deckenden Substrat verwachsen sein kann, einreißt und sich zurückklappt. 1. Unterreihe Phacidiineae.
  2. Apothecien am Scheitel mit einem Loch geöffnet, das sich gleichmäßig erweitert, so daß zuletzt das Hymenium frei steht, ohne von Lappen umgeben zu sein. 2. Unterreihe Pezizineae.
- II. Fruchtkörper mehr oder weniger geschlossen bleibend, im Innern Kammern enthaltend, die von der Schlauchschicht ausgekleidet werden. Unterirdische Pilze. 3. Unterreihe Tuberineae.
- III. Fruchtkörper von vornherein mit offener Fruchtschicht, meist gestielt. 4. Unterreihe Helvellineae.

Aus der Reihe der Pezizineae interessiert hier z. B. *Sclerotinia* FÜCKELIANA DE BARY mit ihrer Conidienfruchtform *Botrytis cinerea* PERS, die unter anderem die Edelfäule der Weintrauben verursacht, aber auch als Zerstörer von Beeren-, Kern- und Steinobst beträchtlichen Schaden anrichtet (vgl. unter Obstkrankheiten).

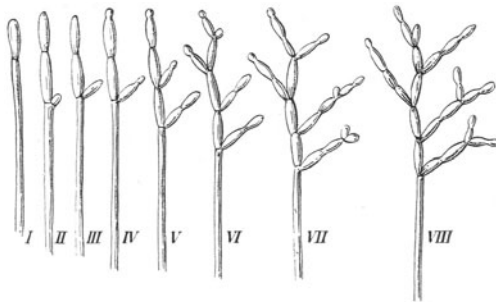


Abb. 99. *Cladosporium herbarum* (300:1). Conidienträger in der sukzessiven Ausbildung seiner Conidien nach kontinuierlicher Beobachtung auf Traubensaft. I. Beginn der Conidienabschnürung; II. nach 3 Stunden; III. nach weiteren 2 $\frac{1}{4}$  Stunden; IV. nach weiteren 10 $\frac{1}{4}$  Stunden; V. nach weiteren 6 Stunden; VI. nach weiteren 2 $\frac{1}{2}$  Stunden; VII. nach weiteren 3 $\frac{1}{2}$  Stunden; VIII. noch später. (Nach E. LOEW.)

Aus der Reihe der Tuberineae werden verschiedene Arten der Gattung *Tuber*, aus der Reihe der Helvellineae verschiedene Arten der Gattungen *Helvella* und *Morchella* im Abschnitt „Speisepilze“ näher behandelt werden.

4. Unterklasse: *Basidiomycetes*.

Am Mycel vieler Formen dieser Gruppe werden sog. Schnallen gebildet, die dadurch entstehen, daß an den Querwänden sich entwickelnde kurze Seitenzweige sich hakenförmig krümmen und mit der benachbarten Zelle oder einem ähnlichen Trieb fusionieren (vgl. S. 1625). Hauptfruchtform die Basidie. Nebenfruchtformen Chlamydo-sporen oder Conidien.

LINDAU teilt die Basidiomycetes folgendermaßen ein:

- A. Conidienträger nur basidienähnlich, aus Chlamydo-sporen hervorgehend, die durch Zerteilung des Mycels entstehen (Haemibasidii). 1. Reihe *Ustilagineae*.
- B. Echte Basidien vorhanden (Eubasidii).
  - a) Basidien mehrzellig (Protobasidiomycetes).
    - I. Basidien fädig, in vier Zellen quer geteilt.
      1. Basidien aus Chlamydo-sporen hervorzuschend. Daneben noch andere Chlamydo-sporen vorhanden. Parasiten. 2. Reihe *Uredineae*.
      2. Basidien nicht aus Chlamydo-sporen hervorgehend. 3. Reihe *Auriculariineae*.
    - II. Basidien fast kugelig, über Kreuz in vier Zellen geteilt. 4. Reihe *Tremellineae*.

- b) Basidien einzellig (Autobasidiomycetes).
1. Basidien langkeulig, an der Spitze sich gabelig in zwei lange Sterigmen teilend. 5. Reihe *Dacryomycetinae*.
  2. Basidien keulig, an der Spitze kurze feine Sterigmen tragend.
    - a) Basidien, ein freistehendes Hymenium bildend.
      - $\alpha$ ) Hymenium ein flaches Lager bildend, ohne Fruchtkörper. 6. Reihe *Exobasidiinae*.
      - $\beta$ ) Hymenium auf einem mehr oder weniger differenzierten Fruchtkörper stehend. 7. Reihe *Hymenomycetinae*.
    - b) Basidien in Hymenien, welche die Wände von Kammern auskleiden. Unterordnungen der *Gasteromycetes*.

Von den Basidiomyceten haben für das vorliegende Werk hauptsächlich nur die Arten eine Bedeutung, die als Speisepilze Verwendung finden bzw. giftige Arten, die mit diesen verwechselt werden können. Sie gehören fast sämtlich zu den *Hymenomycetinae*, einige zu den *Gasteromyceten* und werden später in einem besonderen Abschnitt behandelt.

Zu erwähnen sind weiter die *Ustilagineen* und *Uredineen* sowie schließlich ein mit den Lebensmitteln in keinem Zusammenhang stehender Schädling, der *Hausschwamm*.

Die *Ustilagineen* (*Haemibasidii*, Brandpilze) sind parasitisch in *Phanogamen* lebende Pilze mit verschiedenen Fruchtformen. Die eine schwarzbraune pulverige Masse bildenden „Brandsporen“ keimen mit einem als *Promycel* bezeichneten Keimschlauch, an dem die *Conidien* gebildet werden. *Conidien*, die am *Mycel* selbst auftreten, werden namentlich bei Kulturen in Nährlösungen beobachtet.

Hier interessieren hauptsächlich die auf Getreide vorkommenden Arten der Gattungen *Ustilago*, *Tilletia* und *Urocystis* (s. unter Getreide).

Die *Uredineen* (Rostpilze) sind ebenfalls parasitisch in höheren Pflanzen lebende Pilze, mit verschiedenen Sporenformen (*Pyknidien*, *Aecidien*, *Uredosporen*, *Teleutosporen*, die aber nicht bei allen Arten vorkommen. Von diesen Pilzen, die wegen der rostroten Farbe ihrer *Uredosporenlager* Rostpilze heißen, sind hier die auf und in den Getreidekörnern schmarotzenden Arten bemerkenswert.

### Hausschwamm.

Obwohl der *Hausschwamm* zu den Lebensmitteln in keiner Beziehung steht, erscheint es doch zweckmäßig, diesen *Basidiomyceten* hier zu behandeln, weil sich gezeigt hat, daß eine Reihe von Untersuchungsämtern nicht selten *Hausschwammuntersuchungen* ausführen müssen. Bemerkt sei jedoch ausdrücklich, daß bei derartigen Untersuchungen das eingehende Studium der *Spezialliteratur*<sup>1</sup> nicht zu umgehen ist.

Die als „Schwamm“ bezeichnete Erkrankung des Holzes in Gebäuden wird durch holzerstörende Pilze verursacht<sup>2</sup>. Man unterscheidet *Hausschwamm*, *Trockenfäule* und *Lagerfäule*. Das Merkblatt zur *Hausschwammfrage*<sup>3</sup> gibt hierüber folgende Zusammenstellung:

1. *Hausschwamm*. Erreger: Echter *Hausschwamm*, *Merulius lacrymans* SCHUM. = *M. domesticus* FALCK. Er entwickelt sich auf vorerkranktem Holze (siehe 2c) in geschlossenen feuchten Räumen und bewirkt die mit Bräunung,

<sup>1</sup> A. MÖLLER: *Hausschwammforschungen*, Heft 1—6. Jena 1912; insbesondere Heft 6: R. FALCK: *Die Meruliusfäule des Bauholzes*. — C. MEZ: *Der Hausschwamm*. Dresden 1908.

<sup>2</sup> Eine Zusammenstellung der bis dahin in Häusern beobachteten *Hymenomyceten* findet sich bei C. MEZ: *Der Hausschwamm*. Dresden 1908.

<sup>3</sup> *Hausschwamm-Forschungen*, herausgegeben von A. MÖLLER, 7. Heft, 2. Aufl. Jena 1921.

Vermürbung, starkem Schwund verbundene vollständige Zersetzung des Holzes; er wird mit Recht für den gefährlichsten Zerstörer verbauten Holzes angesehen.

Nächstverwandt sind: Wilder Hausschwamm (*Merulius silvester* FALCK) und kleiner Hausschwamm (*Merulius minor* FALCK); sie entwickeln sich ebenfalls auf vorerkranktem Holze in geschlossenem feuchtem Raum, besitzen aber nicht annähernd die Zerstörungskraft und Verbreitungsfähigkeit wie der echte Hausschwamm. In ihrer Schädlichkeit und praktischen Beurteilung sind sie den Erregern der Trockenfäule etwa gleichzustellen.

2. Trockenfäule. Erreger: a) Porenhaußschwamm (*Polyporus vaporiarius*) entwickelt sich im Hause wie die *Merulius*-arten vorzugsweise auf vorerkranktem Holze (siehe 2c) und kommt in seiner Zerstörungskraft dem echten Hausschwamm am nächsten.

b) Muschelhausschwamm (*Paxillus acheruntius*) ist sehr verbreitet, aber praktisch von geringer Bedeutung.

c) Kellerhausschwamm oder Warzenhausschwamm (*Coniophora cerebella*) entwickelt sich im Gegensatz zu allen vorgenannten Arten auf gesundem

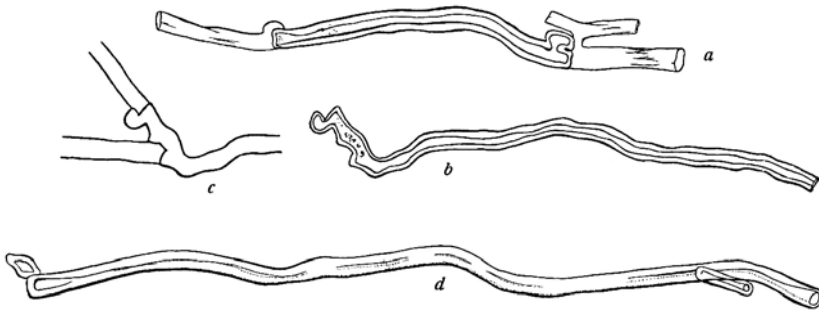


Abb. 100. Typen der Plattenfasern aus der Fruchtkörperplatte von *Merulius domesticus*. (350:1. (O. FALCK). a Kleine Faser mit beiderseits ansitzendem Mutterfaden, links Schnalle am Mutterfaden, rechts Faserschnalle. b Fußfaser. c Knoten mit Doppelschnalle, aus der die Faser b entstanden ist. d Ohne Teilnahme einer Schnalle gebildete, gefüllte Faser mit ösenartigem Lumen an den Enden. Links mit selbständig verdickter Schnallenzelle, rechts kleiner, faserartig verdickter Faserabschnitt. (Aus Hausschwammuntersuchungen, H. 6, S. 37. Jena 1912.)

Holz in feuchtem geschlossenem Raume, bewirkt zunächst die Vorerkrankung, das sog. Angehen des Holzes, dessen Oberflächen meist fest und schwundfrei bleiben: Coniophorafäule ist bei den meisten Schwammfällen mehr oder weniger beteiligt.

3. Lagerfäule. Erreger: Blätterhausschwamm (*Lenzites*-arten); Porenhaußschwamm (*Polyporus*-arten); Grubenschwamm (*Lentinus squamosus* u. a.). Lagerfäule entwickelt sich auf gesundem Holze in offener Luftlage im Freien, bewirkt Vermürbung, Bräunung, Schwund und völlige Zersetzung der inneren Holzteile; lagerfaules Holz kann nach dem Einbau noch vom Hausschwamm und von Trockenfäule befallen werden.

„Der echte Hausschwamm muß von allen anderen Erregern streng unterschieden und gesondert beurteilt werden.“

Bei der folgenden Beschreibung kann auch nur *Merulius domesticus* genauer behandelt werden, während hinsichtlich der anderen Holzzerstörer auf die erwähnte Spezialliteratur verwiesen werden muß.

Die zur Untersuchung gelangenden Objekte können entweder Fruchtkörper enthalten, oder Stränge von wurzelähnlichem Aussehen, oder es finden sich watteartige, spinnwebeartige oder häutige Beläge. Oft sind auch die letzteren an den befallenen eingelieferten Holzstücken nicht unmittelbar erkennbar.

Die Fruchtkörper des echten Hausschwammes sind sehr vielgestaltige, in der Regel aber etwa omeletteförmige, an der Unterseite von Holzteilen oder an Decken und Wänden entstehende Gebilde von fleischig-lederartiger Konsistenz und gelber bis braunroter, zumeist rötlich-gelber bis fleischroter Farbe, die einen rostbraunen Sporenstaub absondern. Das Hymenium bildet auf der Oberfläche stumpfe Falten, die sich später zu gewundenen und gezackten, netzförmigen, ungleich weiten Maschen (1—2 mm) verbinden.

Für die Unterscheidung der naheverwandten Arten kommt neben der Beschaffenheit der Sporen das aus den Grundhyphen der Fruchtkörperplatte bestehende Geflecht, also der unter Hymenium und Trama gelegene Teil in Betracht. Ein Teil der Plattenhyphen ist nämlich

bei *M. domesticus* durch verdickte Membranen und faserartige Ausbildung (Abb. 100) ausgezeichnet (Plattenfasern). In der äußersten Schicht des Gewebes sind diese verdickten Membranen grünlich-gelb bis olivbraun gefärbt. Der Durchmesser der Fasern schwankt zwischen 4,5—9,5  $\mu$  (meist 6 bis 8  $\mu$ ).

Die Sporen (8—11,5:5 bis 6,5  $\mu$ ) sind etwa eiförmig, jedoch in Seitenlage nur auf der einen Seite stark gewölbt, auf der anderen fast gerade. Die derbe Sporenwandung ist glatt, gelbbraun. Im Innern der Spore finden sich regelmäßig hellere, tropfenförmige Gebilde.

Das Mycel des Hausschwammes ist sehr verschieden gestaltet. Die watteartigen, anfangs schneeweißen, später gelben oder rötlichen Luftmycelbildungen lassen reichliche Schnallenbildung (Abb. 101) erkennen, an denen die Bogenverbindung auswächst, also einen neuen Mycelfaden hervorbringt. Solche auswachsende Schnallen sind allerdings nicht für Hausschwamm beweisend, wie früher allgemein angenommen

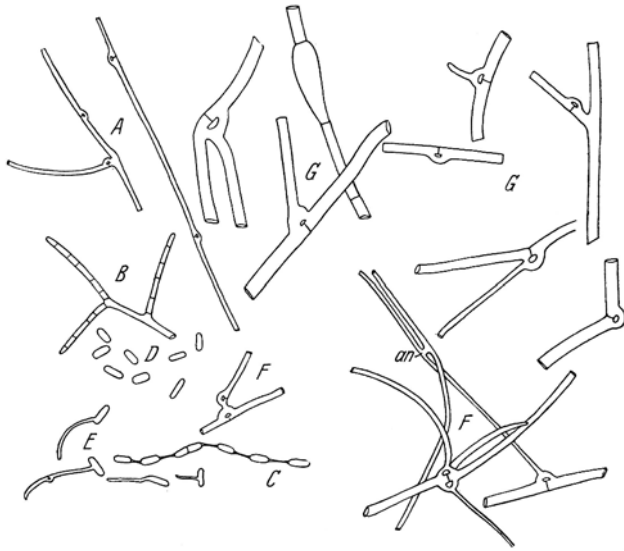


Abb. 101. *Merulius lacrymans*. Hyphen. *A* dünne Hyphen, mit nicht auswachsenden Schnallen; *B* dieselben, Beginn der Oidienbildung; *C* Oidien im Zusammenhang; *D* freie Oidien; *E* keimende Oidien; *F* feine Hyphen aus stärkeren entspringend (bei an Anastomose); *G* dicke Hyphen, mit Schnallenbildungen und auswachsenden Schnallen. (320:1.)  
(C. Mez: Der Hausschwamm, S. 74. Dresden 1908.)

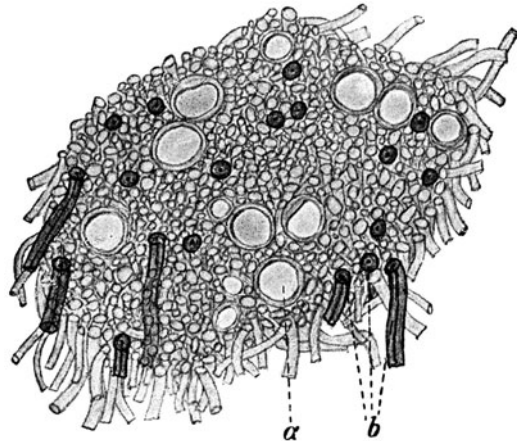


Abb. 102. Querschnitt durch einen Mycelstrang des Hausschwammes, mit Jod behandelt. *a* gefäßartige Hyphen; *b* Faserhyphen. Vergr. 1:375. (C. Mez.)



wurde, da sie auch bei anderen hausbewohnenden Pilzmycelien vorkommen. Immerhin sind sie diagnostisch nicht wertlos.

Wichtig für die Diagnose sind die weißen oder grauen bis federkiel-dicken Mycelstränge, die frisch zäh und biegsam, im ausgetrockneten Zustand spröde und zerbrechlich sind. Ihre Grundmasse besteht aus dünnwandigen Hyphen, in die einerseits bis über  $25\mu$  weite, mehr oder weniger dickwandige Gefäßhyphen (z. T. mit Querbalken und warzenförmigen Wandverdickungen) und andererseits dickwandige sklerenchymartige „Faserhyphen“ (bis über  $5\mu$  Durchmesser) eingebettet sind (Abb. 102). Derartige Faserhyphen kommen auch bei einigen anderen Arten vor. Sie erreichen aber nur bei *Merulius domesticus* einen Durchmesser von  $5\mu$ .

Da man sehr häufig auf Grund der Mycelstränge eine Entscheidung treffen muß, sei nachstehend die von R. Falck<sup>1</sup> gegebene Zusammenstellung der für die Stränge der Holzzerstörer in Betracht kommenden diagnostischen Merkmale wiedergegeben.

#### Strangdiagnosen.

I. Stränge weiß, grau bis graubraun verfärbt; bis bleistift-dick; die dickeren in trockenem Zustande brüchig, starr. Gefäßhyphen in großer Zahl zusammengelagert, verhältnismäßig lose verbunden, die einzelnen Gefäßhyphen weitlumig, mit Balken, Ring und Warzenverdickungen der Membranen. Faserhyphen geradlinig, etwas starr, stark (grünlich) lichtbrechend, in der Rinde alter Stränge bis olivbraun = *Lacrymans*-Gruppe.

a) Stränge aus dem Mycel meist unvollständig differenziert, ohne Rinde. Faserhyphen fehlen. Schlauchhyphendurchmesser bis  $26\mu$  = *Minor*.

b) Stränge meist glatt ausdifferenziert, wurzelähnlich, mit leicht abtrennbarer, dunkelbrauner Rinde, werden bindfadenstark. Faserhyphen stets vorhanden, bis  $3\mu$  breit. Schlauchhyphen bis etwa  $50\mu$  = *Silvester*.

c) Stränge bis bleistift-dick, nicht so vollständig ausdifferenziert wie *Silvester*, sondern mit lappigem Zwischenmycel trocken holzig, starr. Faserhyphen stets vorhanden, meist  $4-5\mu$  breit. Schlauchhyphen bis  $50\mu$  = *Domesticus*.

II. Stränge haardünn, lehm-gelb bis braungelb. Gefäßhyphen englumig, mit Balken, schwer zu isolieren. Faserhyphen lehm-gelb,  $2\mu$  breit. Sklerotienbildung an den Strängen = *Sclerotium*.

III. Stränge rein weiß, filzig, auch nach dem Trocknen biegsam verbleibend, werden bindfadenstark. Gefäßhyphen vereinzelt und schwer zu isolieren, teils dickwandig mit mittelgroßem Lumen; nicht typisch mit Balken, Ringen und Warzenverdickungen wie bei *Merulius*. Faserhyphen sehr zahlreich, fast den ganzen Strang bildend, rein weiß, biegsam, Durchmesser  $2,5-3,5\mu$  = *Vaporarius*-Arten.

IV. Stränge alsbald braun verfärbt. Gefäßhyphen in verhältnismäßig geringer Zahl, schwer zu isolieren, ohne die typische Ausdifferenzierung der *Merulius*-Gruppe. Faserhyphen braun,  $3-4\mu$  = *Coniphora*-Arten.

V. Stränge führen statt der Fasern verdickte, stark lichtbrechende Schnallen-fäden mit unregelmäßigen Konturen = *Paxillus*.

VI. Mycelpolster und strangähnliche Platten fast nur aus gelb, rotbraun oder umbrabraun gefärbten Fasern gebildet,  $2-3\mu$  breit (Fasern braun = *abietina*; rotgelb = *separia*; hellgelb = *thermophila*) = *Lenzites*.

Nach dem bereits erwähnten Merkblatt zur Hausschwammfrage ist für den Nachweis des echten Hausschwammes die Feststellung folgender Merkmale zu fordern:

a) Beim Vorhandensein des Fruchtkörpers:

<sup>1</sup> R. FALCK: Hausschwammforschungen, Heft 6, S. 217. Jena 1912.

1. Sporenmessung,
  2. Nachweis der Plattenfasern.
- b) Beim Vorhandensein der Stränge:
1. Nachweis der Strangfasern von 4—5  $\mu$  Durchmesser;
  2. Nachweis der Gefäßhyphen (über 25  $\mu$  Durchmesser) mit ihren eigentümlichen Balken, Ringen und Wandverdickungen. Falls nur Mycel-lappen vorhanden sind, ist der Nachweis der Strangfasern von 4—5  $\mu$  Durchmesser (b 1) zu erbringen.
- c) Liegt nur befallenes Holz oder junges Mycel vor, so ist der Nachweis des echten Hausschwammes durch kulturelle Prüfung zu erbringen. Es müssen alsdann folgende Merkmale vorhanden sein oder nachgewiesen werden:
1. Kräftiges Ausstrahlen glänzend weißer, schnallenreicher Mycelbüschel in feuchter Kammer.
  2. Die ausstrahlenden Mycelien erreichen, wenn die Übertragung in Reinkulturen gelingt, Hyphendurchmesser von 7—8  $\mu$  und entsprechend breite Schnallen; an den hinteren Knoten Sprosse mit Sekundär-schnalle.
  3. Bei 18—20° bestes Mycelwachstum. Bei 27°C gehemmtes Mycelwachstum.

Zur Sicherung der Bestimmung sind mehrere der unter a, b und c bezeichneten Merkmale festzustellen. Mikroskopische Merkmale zur sicheren Erkennung des echten Hausschwammes in zerstörtem Holze selbst, wenn keine äußeren Mycelien oder Strangbildungen vorliegen, sind zur Zeit nicht bekannt.

Unrichtig sind die folgenden, bisher in der Literatur zur Kennzeichnung des echten Hausschwammes angegebenen Merkmale:

1. Der Nachweis aussprossender Schnallenzellen an den Mycelfäden, die auch bei vielen anderen Arten der holzerstörenden Pilze nachgewiesen wurden.
2. Die Feststellung der Strangfaserhyphen (sklerenchymfaserartige Hyphen) in den Strängen ohne Berücksichtigung ihrer Größenverhältnisse, da ähnliche Fasern sich bei vielen holzerstörenden Pilzarten finden.
3. Die Zellkernuntersuchung. Es hat sich gezeigt, daß die Zellen von *Merulius domesticus* keine anderen Kernverhältnisse besitzen, als die meisten übrigen Holzerstörer, z. B. *Polyporus vaporarius*.
4. Das Auswachsen der Mycelien aus den Kulturgefäßen in feuchtigkeits-gesättigten Räumen; zur Unterscheidung ist dieses Verhalten nicht geeignet, da alle Schwammarten es zeigen.

Die kulturelle Prüfung befallenen Holzes wird folgendermaßen ausgeführt:

Von der Grenze des äußerlich sichtbaren Pilzwachstums am Holz schneidet man etwa 20 cm große Stücke derart aus, daß auf der einen Hälfte deutliches Mycelwachstum bzw. Zerstörung zu sehen ist, auf der anderen Hälfte dagegen noch nicht. Diese Stücke werden einige Stunden in Leitungswasser eingeweicht und dann unter einer Glasglocke feucht gehalten. Falls noch lebendes Mycel vorhanden ist, so erscheinen schon nach wenigen Tagen die watteartigen Mycelrasen der hier in Betracht kommenden Hymenomyceten, von denen man zwecks weiterer Beobachtung Teile auf sterilen Bierwürzeagar zu übertragen versucht.

Für die Untersuchung geeignete Mycelstränge erhält man, wenn man die Holzstücke unter der Glasglocke dicht in Holzwole einpackt und feucht hält, in etwa 3—4 Wochen, sofern es sich um echten Hausschwamm handelt.

#### *Fungi imperfecti.*

Von einer großen Zahl Mycomyceten kennt man Hauptfruchtformen (Ascus, Basidie) nicht, sondern nur Nebenfruchtformen (Conidienträger, Pykniden,

Chlamydosporen usw.). Solange man deshalb nicht imstande ist, solche Pilze in das System einzureihen, stellt man sie in die besondere Gruppe der Fungi imperfecti, die man in „Formengattungen“ zerlegt. Nach der Art der Anordnung der Conidienträger in Pyknidien, offenen Lagern oder in vereinzelter Form unterscheidet man drei Hauptgruppen, die Sphaeropsidaceae, Melanconieae und Hyphomycetes.

LINDAU gibt für die Fungi imperfecti folgende weitere Einteilung:

- I. Ordnung: Sphaeropsidaceae. Nur Pyknidien oder lagerartige Conidienfruchtstände vorhanden.
  - a) Nur Pyknidien vorhanden, schwarz: Sphaeropsidaceae.
  - b) Nur Pyknidien vorhanden, hell gefärbt: Nectrioidaceae.
  - c) Fruchtgehäuse deutlich halbiert, mündungslos oder hysterienartig gespalten: Leptostromataceae.
  - d) Fruchtgehäuse invers, die Conidien von einer Schicht auf der Unterseite des Schildes abgesondert: Pycnothyriaceae.
  - e) Fruchtgehäuse tief schüsselförmig, teller- oder fast becherförmig, oder öfter hysterienartig, anfänglich zuweilen etwas kugelig, bald weit geöffnet, kahl oder behaart: Excipulaceae.
- II. Ordnung: Melanconieae. Fruchtschicht ein conidiales, lagerartiges Gehäuse bildend, ohne besondere Randhülle.
 

Einzige Familie: Melanconiacaceae.
- III. Ordnung: Hyphomycetes. Conidienträger einzeln oder verzweigt. Entweder treten diese einzeln auf oder bilden durch parallele Aneinanderlegung Koremien oder sie schließen sich zu nackten offenen Lagern zusammen.
  - a) Conidien an einzeln stehenden Conidienträgern erzeugt, sehr selten als Oidien entstehend.
    1. Vegetative Hyphen hyalin oder blaß, oder lebhaft gefärbt, ähnlich gefärbt die Conidienträger und Conidien: Mucedinaceae.
    2. Vegetative Hyphen dunkel gefärbt, höchstens an der Spitze etwas blasser, ebenso gefärbt die Conidienträger und Conidien: Dematiaceae.
  - b) Conidienträger zu einem Koremium verbunden, an dessen Spitze die Conidien entstehen: Stilbaceae.
  - c) Conidienträger zu einem lagerartigen Polster zusammentretend, das häufig noch auf einem Stroma steht: Tuberculariaceae.

Von den Sphaeropsidaceae kommt hier in Betracht die Gattung *Phoma* (siehe unter Obstkrankheiten und Rübenkrankheiten), von den Melanconieae die Gattung *Gloeosporium*.

Aus der Ordnung der Hyphomycetes interessieren die Gattungen *Cladosporium*, *Alternaria*, *Sporodesmium*, *Helminthosporium* (vgl. unter Getreide), *Trichothecium* (*Cephalothecium*), *Fusicladium* (vgl. unter Obstkrankheiten), *Stysanus*, *Verticillium* (Kartoffelkrankheiten), *Fusarium* (siehe unter Wasser, Getreide, Obstkrankheiten, Kartoffelkrankheiten), sowie verschiedene Gattungen der *Pseudosaccharomycetes* und der *Oosporeae*.

Zu den *Pseudosaccharomyceten* rechnet man die bereits im Anschluß an die *Saccharomyceten* behandelten Gattungen *Torula* und *Mycoderma* (vgl. S. 1642); von den *Oosporeen* sind *Monilia* und *Oospora* (*Oidium*) von Wichtigkeit, die wegen ihrer weiten Verbreitung nachstehend eingehender behandelt werden sollen.

Die übrigen vorstehend erwähnten Gattungen sollen bei den betreffenden Abschnitten des Handbuches Berücksichtigung finden.

### *Monilia*<sup>1</sup>.

Die *Monilia*arten der technischen Mykologen bilden gewissermaßen ein Zwischenglied zwischen den Pilzen mit Sproßmycel und typischem Fadenmycel. Sie zeichnen sich durch einen außerordentlichen Polymorphismus aus. In dem

<sup>1</sup> WICHMANN hat die Gattung *Monilia* in LAFARS Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, eingehender behandelt.



Abb. 103. *Monilia candida* (Bonorden) HANSEN (900:1). Bodensatzhefe. In einigen der Zellen sind Vakuolen mit lichtbrechenden Körperchen. (Nach HANSEN.)



Abb. 105.



Abb. 104.

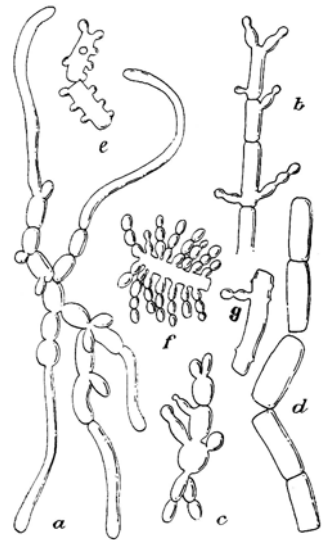


Abb. 106.

Abb. 104. *Monilia candida* (Bonorden) HANSEN (900:1). Zellen aus einer jungen Hautvegetation herührend. (Die glänzenden Körperchen, welche in Abb. 103 abgebildet sind, sind hier nicht gezeichnet.) (Nach HANSEN.)

Abb. 105. *Monilia candida* (Bonorden) HANSEN (750:1). Schimmelvegetation aus einer alten Kultur. *a* Ketten aus mehr oder minder fadenförmigen Zellen, bei jedem Glied öfters ein Kranz von ovalen Hefezellen; *b* dieselbe Form, aber ohne ovale Hefezellen; *c* typisches Mycel mit Querwänden; *d* oidiumähnliche Zellen; *e* birnförmige Zellen; *f* citronenförmige Zellen. (Nach HANSEN.)

Abb. 106. *Monilia variabilis*. (480:1.) *a* Jungdliches Sproßmycel, die Endzellen schlauchförmig verlängert; *b* älterer Faden mit Hefenconidien; *c* hefenähnliches Sproßmycel; *d* oidienartiger Zerfall einer älteren Hyphe; *e* Oidien mit torulähnlichen Conidien; *f* ebenso, die Conidien sprossend — Luftzellen; *g* Oidie nach dem Abwerfen der Conidien basidienähnliche Höcker zeigend. (Nach LINDNER.)

Sproßmycel kommen so ziemlich alle Zellformen der Sproßpilze zur Entwicklung. Das Fadenmycel zeigt im Gegensatz zu dem der meisten typischen Fadenpilze die größte Neigung zur Aufteilung in Oidien.

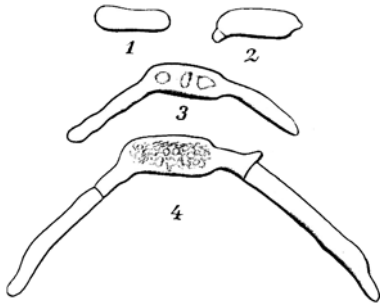


Abb. 107. *Oidium lactis*, Fresenius (etwa 520:1). Die Keimung einer Conidie in Würze in RANVIERS Kammer beobachtet 1. 10<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Uhr, 2. 2 Uhr, 3. 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Uhr. (Nach HANSEN.)

Conidienträger charakteristischer Art werden nicht gebildet oder nur bei wenigen Arten. Die Conidien entstehen überall am vegetativen Mycel und unterscheiden sich auch in der Form meist nicht wesentlich von den vegetativen Zellen. Bemerkenswert sind von den Moniliaarten die von HANSEN genauer beschriebene *M. candida* (Abb. 103—105) und die von LINDNER beschriebene *M. variabilis* (Abb. 106). Erstere tritt auf süßen Früchten, letztere auf Brot auf. Der *Monilia variabilis* nahe verwandte, morphologisch kaum unterscheidbare Arten findet man oft in verdorbenen Vegetabilien.

*M. candida* bildet in jungen flüssigen Kulturen Sproßmycel, während sie auf festem Substrat und in alten flüssigen Kulturen in Form eines Fadenmycels wächst.

*M. variabilis* ist durch einen Polymorphismus ausgezeichnet, wie man ihn nur selten findet. Man vergleiche in dieser Beziehung die Abb. 106, die uns alle Formen des Sproßpilzkreises (Dematium-,

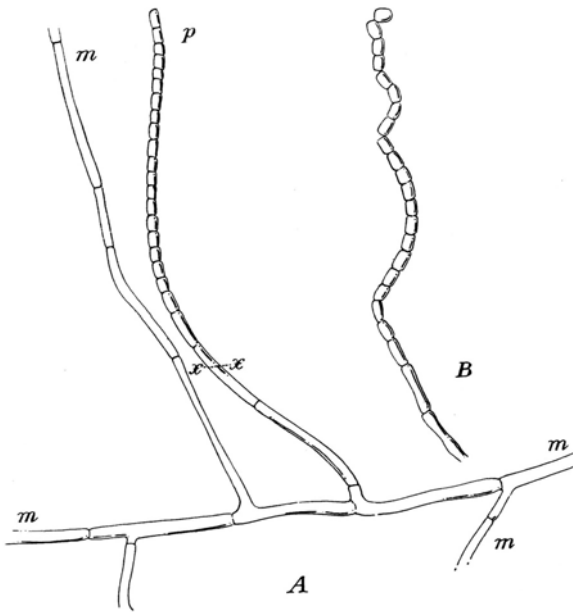


Abb. 108.

Abb. 108. *Oidium lactis* (etwa 300:1). A verzweigte, in dem flüssigen Substrat horizontal ausgebreitete Mycelfäden *m-m*, mit einem bei der Linie *x-x* schräg in die Luft sich erhebenden, durch Querwände in eine Kette zylindrischer Conidien *p* geteilten Aste; B Conidienkette im Beginn der Trennung ihrer Glieder voneinander. (Nach DE BARY.)

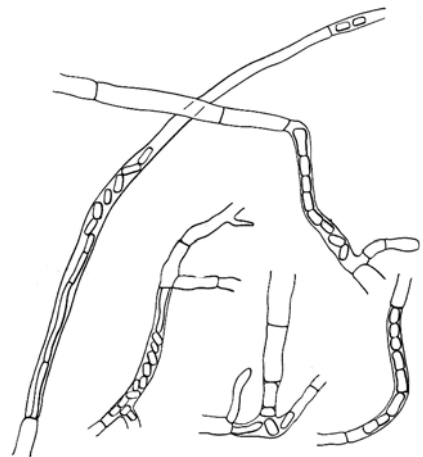


Abb. 109.

Abb. 109. *Oidium lactis* Fresenius (300:1). Durchwachsungserscheinungen. (Nach KLÖCKER und SCHÖNNING.)

Oidium-, Saccharomyces- und Torula-Form) zeigt. Die Monilien rufen in Zuckerlösungen eine schwache alkoholische Gärung hervor.

*Monilia sitophila* (MONT.) Saccardo spielt bei der Herstellung eines Genußmittels aus Arachissamen, Ontjom genannt, in Java eine Rolle.

Die als Erreger von Krankheiten des Kern- und Steinobstes bekannten Arten (*M. fructigena* und *M. cinerea*), die in mancher Hinsicht von den

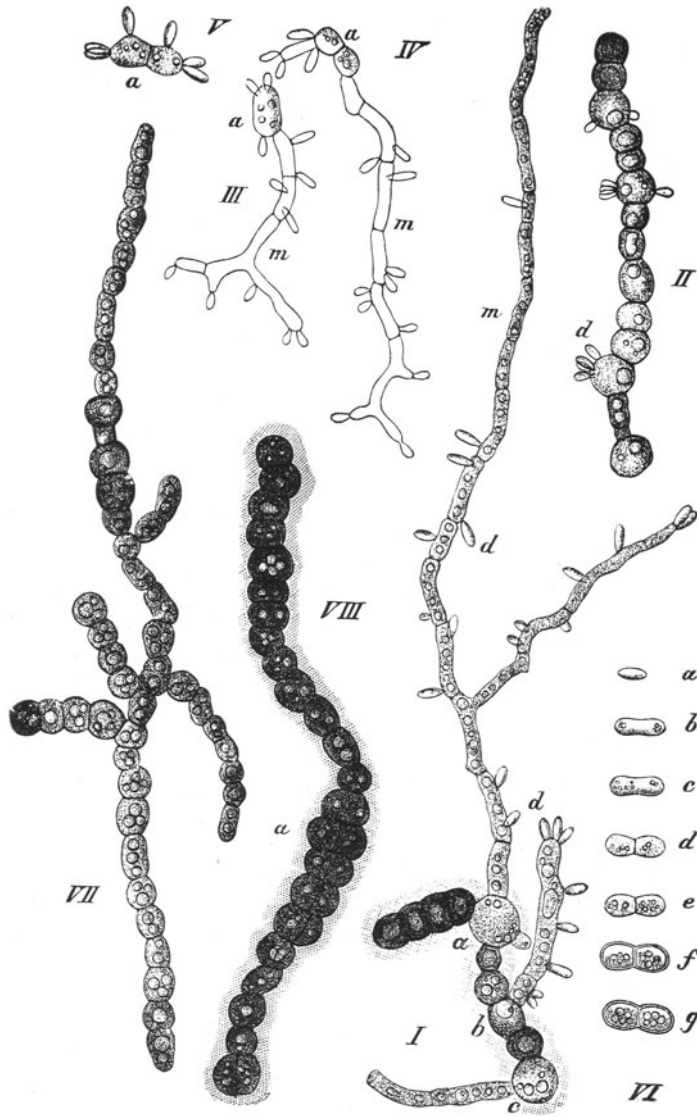


Abb. 110. *Dematium pullulans* DE BARY (540:1).

I. Eine Gemmenkette, drei Glieder derselben (*a*, *b*, *c*) haben Mycelschläuche (*m*) getrieben, an denen Conidien (bei *d*) abgeschnürt werden; II. eine Gemmenkette, unmittelbar Conidien abschnürend (bei *d*); III. eine Conidie *a*, die einen Mycelfaden (*m*) entwickelt hat, an welchem Conidien abgeschnürt werden, selbst bildet sie auch direkt Conidien; IV. Conidie in zwei Zellen geteilt unter ähnlichen Verhältnissen; V. Conidie, in zwei Zellen geteilt, direkt Conidien treibend; VI. *a-g* kontinuierliche Entwicklung ein und derselben Gemme in dünnster Wasserschicht bei reichlichem Luftzutritt zur zweizelligen, dickwandigen, braunen und fettreichen, Gemme; VII. und VIII. Mycelien in lauter kurze, bäuchig aufgeschwollene Glieder geteilt, die zu dickwandigen, meist stark gebräunten, mit großen Öltropfen ausgestatteten Gemmen geworden sind; bei VIII. *a* sieht man mehrere der Gemmen nochmals durch Wände geteilt, die gleichsinnig mit der Achse des Fadens verlaufen.  
(Nach ZOPFS Handbuch.)

gärungserregenden Monilien verschieden sind, sind meist Nebenfruchtformen von *Sclerotinia*-Arten (S. 1652).



# **Tabellen.**



Tabelle I. Beziehungen zwischen Spezifischem Gewicht, Graden BALLING (BRIX) und Graden BAUMÉ bei 17,5°<sup>1</sup>.

| Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ |
|--|--|----------------|--|--|----------------|--|--|----------------|
| 0,0  | 1,00000                                | 0,00           | 4,5  | 1,01770                                | 2,55           | 9,0  | 1,03599                                | 5,10           |
| 0,1  | 1,00038                                | 0,06           | 4,6  | 1,01810                                | 2,61           | 9,1  | 1,03640                                | 5,16           |
| 0,2  | 1,00077                                | 0,11           | 4,7  | 1,01850                                | 2,67           | 9,2  | 1,03682                                | 5,21           |
| 0,3  | 1,00116                                | 0,17           | 4,8  | 1,01890                                | 2,72           | 9,3  | 1,03723                                | 5,27           |
| 0,4  | 1,00155                                | 0,23           | 4,9  | 1,01930                                | 2,78           | 9,4  | 1,03765                                | 5,33           |
| 0,5  | 1,00193                                | 0,28           |  |  |                | 9,5  | 1,03806                                | 5,38           |
| 0,6  | 1,00232                                | 0,34           | 5,0  | 1,01970                                | 2,84           | 9,6  | 1,03848                                | 5,44           |
| 0,7  | 1,00271                                | 0,40           | 5,1  | 1,02010                                | 2,89           | 9,7  | 1,03889                                | 5,50           |
| 0,8  | 1,00310                                | 0,45           | 5,2  | 1,02051                                | 2,95           | 9,8  | 1,03931                                | 5,55           |
| 0,9  | 1,00349                                | 0,51           | 5,3  | 1,02091                                | 3,01           | 9,9  | 1,03972                                | 5,61           |
|  |  |                | 5,4  | 1,02131                                | 3,06           |  |  |                |
| 1,0  | 1,00388                                | 0,57           | 5,5  | 1,02171                                | 3,12           | 10,0   | 1,04014                                | 5,67           |
| 1,1  | 1,00427                                | 0,63           | 5,6  | 1,02211                                | 3,18           | 10,1   | 1,04055                                | 5,72           |
| 1,2  | 1,00466                                | 0,68           | 5,7  | 1,02252                                | 3,23           | 10,2   | 1,04097                                | 5,78           |
| 1,3  | 1,00505                                | 0,74           | 5,8  | 1,02292                                | 3,29           | 10,3   | 1,04139                                | 5,83           |
| 1,4  | 1,00544                                | 0,80           | 5,9  | 1,02333                                | 3,35           | 10,4   | 1,04180                                | 5,89           |
| 1,5  | 1,00583                                | 0,85           |  |  |                | 10,5   | 1,04222                                | 5,95           |
| 1,6  | 1,00622                                | 0,91           | 6,0  | 1,02373                                | 3,40           | 10,6   | 1,04264                                | 6,00           |
| 1,7  | 1,00662                                | 0,97           | 6,1  | 1,02413                                | 3,46           | 10,7   | 1,04306                                | 6,06           |
| 1,8  | 1,00701                                | 1,02           | 6,2  | 1,02454                                | 3,52           | 10,8   | 1,04348                                | 6,12           |
| 1,9  | 1,00740                                | 1,08           | 6,3  | 1,02494                                | 3,57           | 10,9   | 1,04390                                | 6,17           |
|  |  |                | 6,4  | 1,02535                                | 3,63           |  |  |                |
| 2,0  | 1,00779                                | 1,14           | 6,5  | 1,02575                                | 3,69           | 11,0   | 1,04431                                | 6,23           |
| 2,1  | 1,00818                                | 1,19           | 6,6  | 1,02616                                | 3,74           | 11,1   | 1,04473                                | 6,29           |
| 2,2  | 1,00858                                | 1,25           | 6,7  | 1,02657                                | 3,80           | 11,2   | 1,04515                                | 6,34           |
| 2,3  | 1,00897                                | 1,31           | 6,8  | 1,02697                                | 3,86           | 11,3   | 1,04557                                | 6,40           |
| 2,4  | 1,00936                                | 1,36           | 6,9  | 1,02738                                | 3,91           | 11,4   | 1,04599                                | 6,46           |
| 2,5  | 1,00976                                | 1,42           |  |  |                | 11,5   | 1,04641                                | 6,51           |
| 2,6  | 1,01015                                | 1,48           | 7,0  | 1,02779                                | 3,97           | 11,6   | 1,04683                                | 6,57           |
| 2,7  | 1,01055                                | 1,53           | 7,1  | 1,02819                                | 4,03           | 11,7   | 1,04726                                | 6,62           |
| 2,8  | 1,01094                                | 1,59           | 7,2  | 1,02860                                | 4,08           | 11,8   | 1,04768                                | 6,68           |
| 2,9  | 1,01134                                | 1,65           | 7,3  | 1,02901                                | 4,14           | 11,9   | 1,04810                                | 6,74           |
|  |  |                | 7,4  | 1,02942                                | 4,20           |  |  |                |
| 3,0  | 1,01173                                | 1,70           | 7,5  | 1,02983                                | 4,25           | 12,0   | 1,04852                                | 6,79           |
| 3,1  | 1,01213                                | 1,76           | 7,6  | 1,03024                                | 4,31           | 12,1   | 1,04894                                | 6,85           |
| 3,2  | 1,01252                                | 1,82           | 7,7  | 1,03064                                | 4,37           | 12,2   | 1,04937                                | 6,91           |
| 3,3  | 1,01292                                | 1,87           | 7,8  | 1,03105                                | 4,42           | 12,3   | 1,04979                                | 6,96           |
| 3,4  | 1,01332                                | 1,93           | 7,9  | 1,03146                                | 4,48           | 12,4   | 1,05021                                | 7,02           |
| 3,5  | 1,01371                                | 1,99           |  |  |                | 12,5   | 1,05064                                | 7,08           |
| 3,6  | 1,01411                                | 2,04           | 8,0  | 1,03187                                | 4,53           | 12,6   | 1,05106                                | 7,13           |
| 3,7  | 1,01451                                | 2,10           | 8,1  | 1,03228                                | 4,59           | 12,7   | 1,05149                                | 7,19           |
| 3,8  | 1,01491                                | 2,16           | 8,2  | 1,03270                                | 4,65           | 12,8   | 1,05191                                | 7,24           |
| 3,9  | 1,01531                                | 2,21           | 8,3  | 1,03311                                | 4,70           | 12,9   | 1,05233                                | 7,30           |
|  |  |                | 8,4  | 1,03352                                | 4,76           |  |  |                |
| 4,0  | 1,01570                                | 2,27           | 8,5  | 1,03393                                | 4,82           | 13,0   | 1,05276                                | 7,36           |
| 4,1  | 1,01610                                | 2,33           | 8,6  | 1,03434                                | 4,87           | 13,1   | 1,05318                                | 7,41           |
| 4,2  | 1,01650                                | 2,38           | 8,7  | 1,03475                                | 4,93           | 13,2   | 1,05361                                | 7,47           |
| 4,3  | 1,01690                                | 2,44           | 8,8  | 1,03517                                | 4,99           | 13,3   | 1,05404                                | 7,53           |
| 4,4  | 1,01730                                | 2,50           | 8,9  | 1,03558                                | 5,04           | 13,4   | 1,05446                                | 7,58           |

<sup>1</sup> Unter „Graden BAUMÉ“ sind hier die neuen Grade BAUMÉ zu verstehen, wie die von MATEJCHEK und SCHEIBLER nach der von GERLACH aufgestellten neuen Umrechnungsformel berechnet worden sind. Die Unterschiede zwischen alten und neuen Graden sind bei den niederen Graden nur gering; bei den höheren Graden, etwa von 10° anfangend, bis 95°, betragen sie steigend von 0,1—1,0°, um welche die alten Grade niedriger liegen. Im Handel wird noch vielfach an den alten Graden festgehalten.

Tabelle I. Spezifisches Gewicht, Grade BALLING (BRUX) und Grade BAUMÉ. 1665

| Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRUX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br><i>s</i> 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRUX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br><i>s</i> 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRUX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br><i>s</i> 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ |
|--|---|----------------|--|---|----------------|--|---|----------------|
| 13,5   | 1,05489                                       | 7,64           | 19,0   | 1,07884                                       | 10,73          | 24,5   | 1,10375                                       | 13,80          |
| 13,6   | 1,05532                                       | 7,69           | 19,1   | 1,07928                                       | 10,78          | 24,6   | 1,10421                                       | 13,85          |
| 13,7   | 1,05574                                       | 7,75           | 19,2   | 1,07973                                       | 10,84          | 24,7   | 1,10468                                       | 13,91          |
| 13,8   | 1,05617                                       | 7,81           | 19,3   | 1,08017                                       | 10,90          | 24,8   | 1,10514                                       | 13,96          |
| 13,9   | 1,05660                                       | 7,86           | 19,4   | 1,08062                                       | 10,95          | 24,9   | 1,10560                                       | 14,02          |
|  |   |                | 19,5   | 1,08106                                       | 11,01          |  |   |                |
| 14,0   | 1,05703                                       | 7,92           | 19,6   | 1,08151                                       | 11,06          | 25,0   | 1,10607                                       | 14,08          |
| 14,1   | 1,05746                                       | 7,98           | 19,7   | 1,08196                                       | 11,12          | 25,1   | 1,10653                                       | 14,13          |
| 14,2   | 1,05789                                       | 8,03           | 19,8   | 1,08240                                       | 11,18          | 25,2   | 1,10700                                       | 14,19          |
| 14,3   | 1,05831                                       | 8,09           | 19,9   | 1,08285                                       | 11,24          | 25,3   | 1,10746                                       | 14,24          |
| 14,4   | 1,05874                                       | 8,14           |  |   |                | 25,4   | 1,10793                                       | 14,30          |
| 14,5   | 1,05917                                       | 8,20           | 20,0   | 1,08329                                       | 11,29          | 25,5   | 1,10839                                       | 14,35          |
| 14,6   | 1,05960                                       | 8,26           | 20,1   | 1,08374                                       | 11,34          | 25,6   | 1,10886                                       | 14,41          |
| 14,7   | 1,06003                                       | 8,31           | 20,2   | 1,08419                                       | 11,40          | 25,7   | 1,10932                                       | 14,47          |
| 14,8   | 1,06047                                       | 8,37           | 20,3   | 1,08464                                       | 11,45          | 25,8   | 1,10979                                       | 14,52          |
| 14,9   | 1,06090                                       | 8,43           | 20,4   | 1,08509                                       | 11,51          | 25,9   | 1,11026                                       | 14,58          |
|  |   |                | 20,5   | 1,08553                                       | 11,57          |  |   |                |
| 15,0   | 1,06133                                       | 8,48           | 20,6   | 1,08599                                       | 11,62          | 26,0   | 1,11072                                       | 14,63          |
| 15,1   | 1,06176                                       | 8,54           | 20,7   | 1,08643                                       | 11,68          | 26,1   | 1,11119                                       | 14,69          |
| 15,2   | 1,06219                                       | 8,59           | 20,8   | 1,08688                                       | 11,73          | 26,2   | 1,11166                                       | 14,74          |
| 15,3   | 1,06262                                       | 8,65           | 20,9   | 1,08733                                       | 11,79          | 26,3   | 1,11213                                       | 14,80          |
| 15,4   | 1,06306                                       | 8,71           |  |   |                | 26,4   | 1,11259                                       | 14,85          |
| 15,5   | 1,06349                                       | 8,76           | 21,0   | 1,08778                                       | 11,85          | 26,5   | 1,11306                                       | 14,91          |
| 15,6   | 1,06392                                       | 8,82           | 21,1   | 1,08824                                       | 11,90          | 26,6   | 1,11353                                       | 14,97          |
| 15,7   | 1,06436                                       | 8,88           | 21,2   | 1,08869                                       | 11,96          | 26,7   | 1,11400                                       | 15,02          |
| 15,8   | 1,06479                                       | 8,93           | 21,3   | 1,08914                                       | 12,01          | 26,8   | 1,11447                                       | 15,08          |
| 15,9   | 1,06522                                       | 8,99           | 21,4   | 1,08959                                       | 12,07          | 26,9   | 1,11494                                       | 15,13          |
|  |   |                | 21,5   | 1,09004                                       | 12,13          |  |   |                |
| 16,0   | 1,06566                                       | 9,04           | 21,6   | 1,09049                                       | 12,18          | 27,0   | 1,11541                                       | 15,19          |
| 16,1   | 1,06609                                       | 9,10           | 21,7   | 1,09095                                       | 12,24          | 27,1   | 1,11588                                       | 15,24          |
| 16,2   | 1,06653                                       | 9,16           | 21,8   | 1,09140                                       | 12,29          | 27,2   | 1,11635                                       | 15,30          |
| 16,3   | 1,06696                                       | 9,21           | 21,9   | 1,09185                                       | 12,35          | 27,3   | 1,11682                                       | 15,35          |
| 16,4   | 1,06740                                       | 9,27           |  |   |                | 27,4   | 1,11729                                       | 15,41          |
| 16,5   | 1,06783                                       | 9,33           | 22,0   | 1,09231                                       | 12,40          | 27,5   | 1,11776                                       | 15,46          |
| 16,6   | 1,06827                                       | 9,38           | 22,1   | 1,09276                                       | 12,46          | 27,6   | 1,11824                                       | 15,52          |
| 16,7   | 1,06871                                       | 9,44           | 22,2   | 1,09321                                       | 12,52          | 27,7   | 1,11871                                       | 15,58          |
| 16,8   | 1,06914                                       | 9,49           | 22,3   | 1,09367                                       | 12,57          | 27,8   | 1,11918                                       | 15,63          |
| 16,9   | 1,06958                                       | 9,55           | 22,4   | 1,09412                                       | 12,63          | 27,9   | 1,11965                                       | 15,69          |
|  |   |                | 22,5   | 1,09458                                       | 12,68          |  |   |                |
| 17,0   | 1,07002                                       | 9,61           | 22,6   | 1,09503                                       | 12,74          | 28,0   | 1,12013                                       | 15,74          |
| 17,1   | 1,07046                                       | 9,66           | 22,7   | 1,09549                                       | 12,80          | 28,1   | 1,12060                                       | 15,80          |
| 17,2   | 1,07090                                       | 9,72           | 22,8   | 1,09595                                       | 12,85          | 28,2   | 1,12107                                       | 15,85          |
| 17,3   | 1,07133                                       | 9,77           | 22,9   | 1,09640                                       | 12,91          | 28,3   | 1,12155                                       | 15,91          |
| 17,4   | 1,07177                                       | 9,83           |  |   |                | 28,4   | 1,12202                                       | 15,96          |
| 17,5   | 1,07221                                       | 9,89           | 23,0   | 1,09686                                       | 12,96          | 28,5   | 1,12250                                       | 16,02          |
| 17,6   | 1,07265                                       | 9,94           | 23,1   | 1,09732                                       | 13,02          | 28,6   | 1,12297                                       | 16,07          |
| 17,7   | 1,07309                                       | 10,00          | 23,2   | 1,09777                                       | 13,07          | 28,7   | 1,12345                                       | 16,13          |
| 17,8   | 1,07358                                       | 10,06          | 23,3   | 1,09823                                       | 13,13          | 28,8   | 1,12393                                       | 16,18          |
| 17,9   | 1,07397                                       | 10,11          | 23,4   | 1,09869                                       | 13,19          | 28,9   | 1,12440                                       | 16,24          |
|  |   |                | 23,5   | 1,09915                                       | 13,24          |  |   |                |
| 18,0   | 1,07441                                       | 10,17          | 23,6   | 1,09961                                       | 13,30          | 29,0   | 1,12488                                       | 16,30          |
| 18,1   | 1,07485                                       | 10,22          | 23,7   | 1,10007                                       | 13,35          | 29,1   | 1,12536                                       | 16,35          |
| 18,2   | 1,07530                                       | 10,28          | 23,8   | 1,10053                                       | 13,41          | 29,2   | 1,12583                                       | 16,41          |
| 18,3   | 1,07574                                       | 10,33          | 23,9   | 1,10099                                       | 13,46          | 29,3   | 1,12631                                       | 16,46          |
| 18,4   | 1,07618                                       | 10,39          |  |   |                | 29,4   | 1,12679                                       | 16,52          |
| 18,5   | 1,07662                                       | 10,45          | 24,0   | 1,10145                                       | 13,52          | 29,5   | 1,12727                                       | 16,57          |
| 18,6   | 1,07706                                       | 10,50          | 24,1   | 1,10191                                       | 13,58          | 29,6   | 1,12775                                       | 16,63          |
| 18,7   | 1,07751                                       | 10,56          | 24,2   | 1,10237                                       | 13,63          | 29,7   | 1,12823                                       | 16,68          |
| 18,8   | 1,07795                                       | 10,62          | 24,3   | 1,10283                                       | 13,69          | 29,8   | 1,12871                                       | 16,74          |
| 18,9   | 1,07839                                       | 10,67          | 24,4   | 1,10329                                       | 13,74          | 29,9   | 1,12919                                       | 16,79          |

1666 Tabelle I. Spezifisches Gewicht, Grade BALLING (BRIX) und Grade BAUMÉ.

| Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ |
|--|--|----------------|--|--|----------------|--|--|----------------|
| 30,0   | 1,12967                                | 16,85          | 35,5   | 1,15661                                | 19,87          | 41,0   | 1,18460                                | 22,87          |
| 30,1   | 1,13015                                | 16,90          | 35,6   | 1,15710                                | 19,93          | 41,1   | 1,18512                                | 22,93          |
| 30,2   | 1,13063                                | 16,96          | 35,7   | 1,15760                                | 19,98          | 41,2   | 1,18564                                | 22,98          |
| 30,3   | 1,13111                                | 17,01          | 35,8   | 1,15810                                | 20,04          | 41,3   | 1,18616                                | 23,04          |
| 30,4   | 1,13159                                | 17,07          | 35,9   | 1,15861                                | 20,09          | 41,4   | 1,18668                                | 23,09          |
| 30,5   | 1,13207                                | 17,12          |  |  |                | 41,5   | 1,18720                                | 23,15          |
| 30,6   | 1,13255                                | 17,18          | 36,0   | 1,15911                                | 20,15          | 41,6   | 1,18772                                | 23,20          |
| 30,7   | 1,13304                                | 17,23          | 36,1   | 1,15961                                | 20,20          | 41,7   | 1,18824                                | 23,25          |
| 30,8   | 1,13352                                | 17,29          | 36,2   | 1,16011                                | 20,26          | 41,8   | 1,18877                                | 23,31          |
| 30,9   | 1,13400                                | 17,35          | 36,3   | 1,16061                                | 20,31          | 41,9   | 1,18929                                | 23,36          |
|  |  |                | 36,4   | 1,16111                                | 20,37          |  |  |                |
| 31,0   | 1,13449                                | 17,40          | 36,5   | 1,16162                                | 20,42          | 42,0   | 1,18981                                | 23,42          |
| 31,1   | 1,13497                                | 17,46          | 36,6   | 1,16212                                | 20,48          | 42,1   | 1,19033                                | 23,47          |
| 31,2   | 1,13545                                | 17,51          | 36,7   | 1,16262                                | 20,53          | 42,2   | 1,19086                                | 23,52          |
| 31,3   | 1,13594                                | 17,57          | 36,8   | 1,16313                                | 20,59          | 42,3   | 1,19138                                | 23,58          |
| 31,4   | 1,13642                                | 17,62          | 36,9   | 1,16363                                | 20,64          | 42,4   | 1,19190                                | 23,63          |
| 31,5   | 1,13691                                | 17,68          |  |  |                | 42,5   | 1,19243                                | 23,69          |
| 31,6   | 1,13740                                | 17,73          | 37,0   | 1,16413                                | 20,70          | 42,6   | 1,19295                                | 23,74          |
| 31,7   | 1,13788                                | 17,79          | 37,1   | 1,16464                                | 20,75          | 42,7   | 1,19348                                | 23,79          |
| 31,8   | 1,13837                                | 17,84          | 37,2   | 1,16514                                | 20,80          | 42,8   | 1,19400                                | 23,85          |
| 31,9   | 1,13885                                | 17,90          | 37,3   | 1,16565                                | 20,86          | 42,9   | 1,19453                                | 23,90          |
|  |  |                | 37,4   | 1,16616                                | 20,91          |  |  |                |
| 32,0   | 1,13934                                | 17,95          | 37,5   | 1,16666                                | 20,97          | 43,0   | 1,19505                                | 23,96          |
| 32,1   | 1,13983                                | 18,01          | 37,6   | 1,16717                                | 21,02          | 43,1   | 1,19558                                | 24,01          |
| 32,2   | 1,14032                                | 18,06          | 37,7   | 1,16768                                | 21,08          | 43,2   | 1,19611                                | 24,07          |
| 32,3   | 1,14081                                | 18,12          | 37,8   | 1,16818                                | 21,13          | 43,3   | 1,19669                                | 24,12          |
| 32,4   | 1,14129                                | 18,17          | 37,9   | 1,16869                                | 21,19          | 43,4   | 1,19716                                | 24,17          |
| 32,5   | 1,14178                                | 18,23          |  |  |                | 43,5   | 1,19769                                | 24,23          |
| 32,6   | 1,14227                                | 18,28          | 38,0   | 1,16920                                | 21,24          | 43,6   | 1,19822                                | 24,28          |
| 32,7   | 1,14276                                | 18,34          | 38,1   | 1,16971                                | 21,30          | 43,7   | 1,19875                                | 24,34          |
| 32,8   | 1,14325                                | 18,39          | 38,2   | 1,17022                                | 21,35          | 43,8   | 1,19927                                | 24,39          |
| 32,9   | 1,14374                                | 18,45          | 38,3   | 1,17072                                | 21,40          | 43,9   | 1,19980                                | 24,44          |
|  |  |                | 38,4   | 1,17122                                | 21,46          |  |  |                |
| 33,0   | 1,14423                                | 18,50          | 38,5   | 1,17174                                | 21,51          | 44,0   | 1,20033                                | 24,50          |
| 33,1   | 1,14472                                | 18,56          | 38,6   | 1,17225                                | 21,57          | 44,1   | 1,20086                                | 24,55          |
| 33,2   | 1,14521                                | 18,61          | 38,7   | 1,17276                                | 21,62          | 44,2   | 1,20139                                | 24,61          |
| 33,3   | 1,14570                                | 18,67          | 38,8   | 1,17327                                | 21,68          | 44,3   | 1,20192                                | 24,66          |
| 33,4   | 1,14620                                | 18,72          | 38,9   | 1,17379                                | 21,73          | 44,4   | 1,20245                                | 24,71          |
| 33,5   | 1,14669                                | 18,78          |  |  |                | 44,5   | 1,20299                                | 24,77          |
| 33,6   | 1,14718                                | 18,83          | 39,0   | 1,17430                                | 21,79          | 44,6   | 1,20352                                | 24,82          |
| 33,7   | 1,14767                                | 18,89          | 39,1   | 1,17481                                | 21,84          | 44,7   | 1,20405                                | 24,88          |
| 33,8   | 1,14817                                | 18,94          | 39,2   | 1,17532                                | 21,90          | 44,8   | 1,20458                                | 24,93          |
| 33,9   | 1,14866                                | 19,00          | 39,3   | 1,17583                                | 21,95          | 44,9   | 1,20512                                | 24,98          |
|  |  |                | 39,4   | 1,17635                                | 22,00          |  |  |                |
| 34,0   | 1,14915                                | 19,05          | 39,5   | 1,17686                                | 22,06          | 45,0   | 1,20565                                | 25,04          |
| 34,1   | 1,14965                                | 19,11          | 39,6   | 1,17737                                | 22,11          | 45,1   | 1,20618                                | 25,09          |
| 34,2   | 1,15014                                | 19,16          | 39,7   | 1,17789                                | 22,17          | 45,2   | 1,20672                                | 25,14          |
| 34,3   | 1,15064                                | 19,22          | 39,8   | 1,17840                                | 22,22          | 45,3   | 1,20725                                | 25,20          |
| 34,4   | 1,15113                                | 19,27          | 39,9   | 1,17892                                | 22,28          | 45,4   | 1,20779                                | 25,25          |
| 34,5   | 1,15163                                | 19,33          |  |  |                | 45,5   | 1,20832                                | 25,31          |
| 34,6   | 1,15213                                | 19,38          | 40,0   | 1,17943                                | 22,33          | 45,6   | 1,20886                                | 25,36          |
| 34,7   | 1,15262                                | 19,44          | 40,1   | 1,17995                                | 22,38          | 45,7   | 1,20939                                | 25,41          |
| 34,8   | 1,15312                                | 19,49          | 40,2   | 1,18046                                | 22,44          | 45,8   | 1,20993                                | 25,47          |
| 34,9   | 1,15362                                | 19,55          | 40,3   | 1,18098                                | 22,49          | 45,9   | 1,21046                                | 25,52          |
|  |  |                | 40,4   | 1,18150                                | 22,55          |  |  |                |
| 35,0   | 1,15411                                | 19,60          | 40,5   | 1,18201                                | 22,60          | 46,0   | 1,21100                                | 25,57          |
| 35,1   | 1,15461                                | 19,66          | 40,6   | 1,18253                                | 22,66          | 46,1   | 1,21154                                | 25,63          |
| 35,2   | 1,15511                                | 19,71          | 40,7   | 1,18305                                | 22,71          | 46,2   | 1,21208                                | 25,68          |
| 35,3   | 1,15561                                | 19,76          | 40,8   | 1,18357                                | 22,77          | 46,3   | 1,21261                                | 25,74          |
| 35,4   | 1,15611                                | 19,82          | 40,9   | 1,18408                                | 22,82          | 46,4   | 1,21315                                | 25,79          |

Tabelle I. Spezifisches Gewicht, Grade BALLING (BRIX) und Grade BAUMÉ. 1667

| Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ |
|--|--|----------------|--|--|----------------|--|--|----------------|
| 46,5   | 1,21369                                | 25,84          | 52,0   | 1,24390                                | 28,78          | 57,5   | 1,27525                                | 31,68          |
| 46,6   | 1,21423                                | 25,90          | 52,1   | 1,24446                                | 28,83          | 57,6   | 1,27583                                | 31,73          |
| 46,7   | 1,21477                                | 25,95          | 52,2   | 1,24502                                | 28,89          | 57,7   | 1,27641                                | 31,79          |
| 46,8   | 1,21531                                | 26,00          | 52,3   | 1,24558                                | 28,94          | 57,8   | 1,27699                                | 31,84          |
| 46,9   | 1,21585                                | 26,06          | 52,4   | 1,24614                                | 28,99          | 57,9   | 1,27758                                | 31,89          |
|  |  |                | 52,5   | 1,24670                                | 29,05          |  |  |                |
| 47,0   | 1,21639                                | 26,11          | 52,6   | 1,24726                                | 29,10          | 58,0   | 1,27816                                | 31,94          |
| 47,1   | 1,21693                                | 26,17          | 52,7   | 1,24782                                | 29,15          | 58,1   | 1,27874                                | 32,00          |
| 47,2   | 1,21747                                | 26,22          | 52,8   | 1,24839                                | 29,20          | 58,2   | 1,27932                                | 32,05          |
| 47,3   | 1,21802                                | 26,27          | 52,9   | 1,24895                                | 29,26          | 58,3   | 1,27991                                | 32,10          |
| 47,4   | 1,21856                                | 26,33          |  |  |                | 58,4   | 1,28049                                | 32,15          |
| 47,5   | 1,21910                                | 26,38          | 53,0   | 1,24951                                | 29,31          | 58,5   | 1,28107                                | 32,20          |
| 47,6   | 1,21964                                | 26,43          | 53,1   | 1,25008                                | 29,36          | 58,6   | 1,28166                                | 32,26          |
| 47,7   | 1,22019                                | 26,49          | 53,2   | 1,25064                                | 29,42          | 58,7   | 1,28224                                | 32,31          |
| 47,8   | 1,22073                                | 26,54          | 53,3   | 1,25120                                | 29,47          | 58,8   | 1,28283                                | 32,36          |
| 47,9   | 1,22127                                | 26,59          | 53,4   | 1,25177                                | 29,52          | 58,9   | 1,28342                                | 32,41          |
|  |  |                | 53,5   | 1,25233                                | 29,57          |  |  |                |
| 48,0   | 1,22182                                | 26,65          | 53,6   | 1,25290                                | 29,63          | 59,0   | 1,28400                                | 32,46          |
| 48,1   | 1,22236                                | 26,70          | 53,7   | 1,25347                                | 29,68          | 59,1   | 1,28459                                | 32,52          |
| 48,2   | 1,22291                                | 26,75          | 53,8   | 1,25403                                | 29,73          | 59,2   | 1,28518                                | 32,57          |
| 48,3   | 1,22345                                | 26,81          | 53,9   | 1,25460                                | 29,79          | 59,3   | 1,28576                                | 32,62          |
| 48,4   | 1,22400                                | 26,86          |  |  |                | 59,4   | 1,28635                                | 32,67          |
| 48,5   | 1,22455                                | 26,92          | 54,0   | 1,25517                                | 29,84          | 59,5   | 1,28694                                | 32,73          |
| 48,6   | 1,22509                                | 26,97          | 54,1   | 1,25573                                | 29,89          | 59,6   | 1,28753                                | 32,78          |
| 48,7   | 1,22564                                | 27,02          | 54,2   | 1,25630                                | 29,94          | 59,7   | 1,28812                                | 32,83          |
| 48,8   | 1,22619                                | 27,08          | 54,3   | 1,25687                                | 30,00          | 59,8   | 1,28871                                | 32,88          |
| 48,9   | 1,22673                                | 27,13          | 54,4   | 1,25744                                | 30,05          | 59,9   | 1,28930                                | 32,93          |
|  |  |                | 54,5   | 1,25801                                | 30,10          |  |  |                |
| 49,0   | 1,22728                                | 27,18          | 54,6   | 1,25857                                | 30,16          | 60,0   | 1,28989                                | 32,99          |
| 49,1   | 1,22783                                | 27,24          | 54,7   | 1,25914                                | 30,21          | 60,1   | 1,29048                                | 33,04          |
| 49,2   | 1,22838                                | 27,29          | 54,8   | 1,25971                                | 30,26          | 60,2   | 1,29107                                | 33,09          |
| 49,3   | 1,22893                                | 27,34          | 54,9   | 1,26028                                | 30,31          | 60,3   | 1,29166                                | 33,14          |
| 49,4   | 1,22948                                | 27,40          |  |  |                | 60,4   | 1,29225                                | 33,20          |
| 49,5   | 1,23003                                | 27,45          | 55,0   | 1,26086                                | 30,37          | 60,5   | 1,29284                                | 33,25          |
| 49,6   | 1,23058                                | 27,50          | 55,1   | 1,26143                                | 30,42          | 60,6   | 1,29343                                | 33,30          |
| 49,7   | 1,23113                                | 27,56          | 55,2   | 1,26200                                | 30,47          | 60,7   | 1,29403                                | 33,35          |
| 49,8   | 1,23168                                | 27,61          | 55,3   | 1,26257                                | 30,53          | 60,8   | 1,29462                                | 33,40          |
| 49,9   | 1,23223                                | 27,66          | 55,4   | 1,26314                                | 30,58          | 60,9   | 1,29521                                | 33,46          |
|  |  |                | 55,5   | 1,26372                                | 30,63          |  |  |                |
| 50,0   | 1,23278                                | 27,72          | 55,6   | 1,26429                                | 30,68          | 61,0   | 1,29581                                | 33,51          |
| 50,1   | 1,23334                                | 27,77          | 55,7   | 1,26486                                | 30,74          | 61,1   | 1,29646                                | 33,56          |
| 50,2   | 1,23389                                | 27,82          | 55,8   | 1,26544                                | 30,79          | 61,2   | 1,29700                                | 33,61          |
| 50,3   | 1,23444                                | 27,88          | 55,9   | 1,26601                                | 30,84          | 61,3   | 1,29759                                | 33,66          |
| 50,4   | 1,23499                                | 27,93          |  |  |                | 61,4   | 1,29819                                | 33,71          |
| 50,5   | 1,23555                                | 27,98          | 56,0   | 1,26658                                | 30,89          | 61,5   | 1,29878                                | 33,77          |
| 50,6   | 1,23610                                | 28,04          | 56,1   | 1,26716                                | 30,95          | 61,6   | 1,29938                                | 33,82          |
| 50,7   | 1,23666                                | 28,09          | 56,2   | 1,26773                                | 31,00          | 61,7   | 1,29998                                | 33,87          |
| 50,8   | 1,23721                                | 28,14          | 56,3   | 1,26831                                | 31,05          | 61,8   | 1,30057                                | 33,92          |
| 50,9   | 1,23777                                | 28,20          | 56,4   | 1,26889                                | 31,10          | 61,9   | 1,30117                                | 33,97          |
|  |  |                | 56,5   | 1,26946                                | 31,16          |  |  |                |
| 51,0   | 1,23832                                | 28,25          | 56,6   | 1,27004                                | 31,21          | 62,0   | 1,30177                                | 34,03          |
| 51,1   | 1,23888                                | 28,30          | 56,7   | 1,27062                                | 31,26          | 62,1   | 1,30237                                | 34,08          |
| 51,2   | 1,23943                                | 28,36          | 56,8   | 1,27120                                | 31,31          | 62,2   | 1,30297                                | 34,13          |
| 51,3   | 1,23999                                | 28,41          | 56,9   | 1,27177                                | 31,37          | 62,3   | 1,30356                                | 34,18          |
| 51,4   | 1,24055                                | 28,46          |  |  |                | 62,4   | 1,30416                                | 34,23          |
| 51,5   | 1,24111                                | 28,51          | 57,0   | 1,27235                                | 31,42          | 62,5   | 1,30476                                | 34,28          |
| 51,6   | 1,24166                                | 28,57          | 57,1   | 1,27293                                | 31,47          | 62,6   | 1,30536                                | 34,34          |
| 51,7   | 1,24222                                | 28,62          | 57,2   | 1,27351                                | 31,52          | 62,7   | 1,30596                                | 34,39          |
| 51,8   | 1,24278                                | 28,67          | 57,3   | 1,27409                                | 31,58          | 62,8   | 1,30657                                | 34,44          |
| 51,9   | 1,24334                                | 28,73          | 57,4   | 1,27467                                | 31,63          | 62,9   | 1,30717                                | 34,49          |

1668 Tabelle I. Spezifisches Gewicht, Grade BALLING (BRIX) und Grade BAUMÉ.

| Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX))<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br>s 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ |
|--|--|----------------|---|--|----------------|--|--|----------------|
| 63,0   | 1,30777                                | 34,54          | 68,5  | 1,34148                                | 37,36          | 74,0   | 1,37639                                | 40,14          |
| 63,1   | 1,30837                                | 34,59          | 68,6  | 1,34210                                | 37,41          | 74,1   | 1,37704                                | 40,19          |
| 63,2   | 1,30897                                | 34,65          | 68,7  | 1,34273                                | 37,47          | 74,2   | 1,37768                                | 40,24          |
| 63,3   | 1,30958                                | 34,70          | 68,8  | 1,34335                                | 37,52          | 74,3   | 1,37833                                | 40,29          |
| 63,4   | 1,31018                                | 34,75          | 68,9  | 1,34398                                | 37,57          | 74,4   | 1,37898                                | 40,34          |
| 63,5   | 1,31078                                | 34,80          |   |  |                | 74,5   | 1,37962                                | 40,39          |
| 63,6   | 1,31139                                | 34,85          | 69,0  | 1,34460                                | 37,62          | 74,6   | 1,38027                                | 40,44          |
| 63,7   | 1,31199                                | 34,90          | 69,1  | 1,34523                                | 37,67          | 74,7   | 1,38092                                | 40,49          |
| 63,8   | 1,31260                                | 34,96          | 69,2  | 1,34585                                | 37,72          | 74,8   | 1,38157                                | 40,54          |
| 63,9   | 1,31320                                | 35,01          | 69,3  | 1,34648                                | 37,77          | 74,9   | 1,38222                                | 40,59          |
|  |  |                | 69,4  | 1,34711                                | 37,82          |  |  |                |
| 64,0   | 1,31381                                | 35,06          | 69,5  | 1,34774                                | 37,87          | 75,0   | 1,38287                                | 40,64          |
| 64,1   | 1,31442                                | 35,11          | 69,6  | 1,34836                                | 37,92          | 75,1   | 1,38352                                | 40,69          |
| 64,2   | 1,31502                                | 35,16          | 69,7  | 1,34899                                | 37,97          | 75,2   | 1,38417                                | 40,74          |
| 64,3   | 1,31563                                | 35,21          | 69,8  | 1,34962                                | 38,02          | 75,3   | 1,38482                                | 40,79          |
| 64,4   | 1,31624                                | 35,27          | 69,9  | 1,35025                                | 38,07          | 75,4   | 1,38547                                | 40,84          |
| 64,5   | 1,31684                                | 35,32          |   |  |                | 75,5   | 1,38612                                | 40,89          |
| 64,6   | 1,31745                                | 35,37          | 70,0  | 1,35088                                | 38,12          | 75,6   | 1,38677                                | 40,94          |
| 64,7   | 1,31806                                | 35,42          | 70,1  | 1,35155                                | 38,18          | 75,7   | 1,38743                                | 40,99          |
| 64,8   | 1,31867                                | 35,47          | 70,2  | 1,35214                                | 38,23          | 75,8   | 1,38808                                | 41,04          |
| 64,9   | 1,31928                                | 35,52          | 70,3  | 1,35277                                | 38,28          | 75,9   | 1,38873                                | 41,09          |
|  |  |                | 70,4  | 1,35340                                | 38,33          |  |  |                |
| 65,0   | 1,31989                                | 35,57          | 70,5  | 1,35403                                | 38,38          | 76,0   | 1,38939                                | 41,14          |
| 65,1   | 1,32050                                | 35,63          | 70,6  | 1,35466                                | 38,43          | 76,1   | 1,39004                                | 41,19          |
| 65,2   | 1,32111                                | 35,68          | 70,7  | 1,35530                                | 38,48          | 76,2   | 1,39070                                | 41,24          |
| 65,3   | 1,32172                                | 35,73          | 70,8  | 1,35593                                | 38,53          | 76,3   | 1,39135                                | 41,29          |
| 65,4   | 1,32233                                | 35,78          | 70,9  | 1,35656                                | 38,58          | 76,4   | 1,39201                                | 41,33          |
| 65,5   | 1,32294                                | 35,83          |   |  |                | 76,5   | 1,39266                                | 41,38          |
| 65,6   | 1,32355                                | 35,88          | 71,0  | 1,35720                                | 38,63          | 76,6   | 1,39332                                | 41,43          |
| 65,7   | 1,32417                                | 35,93          | 71,1  | 1,35783                                | 38,68          | 76,7   | 1,39397                                | 41,48          |
| 65,8   | 1,32478                                | 35,98          | 71,2  | 1,35847                                | 38,73          | 76,8   | 1,39463                                | 41,53          |
| 65,9   | 1,32539                                | 36,04          | 71,3  | 1,35910                                | 38,78          | 76,9   | 1,39529                                | 41,58          |
|  |  |                | 71,4  | 1,35974                                | 38,83          |  |  |                |
| 66,0   | 1,32601                                | 36,09          | 71,5  | 1,36037                                | 38,88          | 77,0   | 1,39595                                | 41,63          |
| 66,1   | 1,32662                                | 36,14          | 71,6  | 1,36101                                | 38,93          | 77,1   | 1,39660                                | 41,68          |
| 66,2   | 1,32724                                | 36,19          | 71,7  | 1,36164                                | 38,98          | 77,2   | 1,39726                                | 41,73          |
| 66,3   | 1,32785                                | 36,24          | 71,8  | 1,36228                                | 39,03          | 77,3   | 1,39792                                | 41,78          |
| 66,4   | 1,32847                                | 36,29          | 71,9  | 1,36292                                | 39,08          | 77,4   | 1,39858                                | 41,83          |
| 66,5   | 1,32908                                | 36,34          |   |  |                | 77,5   | 1,39924                                | 41,88          |
| 66,6   | 1,32970                                | 36,39          | 72,0  | 1,36355                                | 39,13          | 77,6   | 1,39990                                | 41,93          |
| 66,7   | 1,33031                                | 36,45          | 72,1  | 1,36419                                | 39,19          | 77,7   | 1,40056                                | 41,98          |
| 66,8   | 1,33093                                | 36,50          | 72,2  | 1,36483                                | 39,24          | 77,8   | 1,40122                                | 42,03          |
| 66,9   | 1,33155                                | 36,55          | 72,3  | 1,36547                                | 39,29          | 77,9   | 1,40188                                | 42,08          |
|  |  |                | 72,4  | 1,36611                                | 39,34          |  |  |                |
| 67,0   | 1,33217                                | 36,60          | 72,5  | 1,36675                                | 39,39          | 78,0   | 1,40254                                | 42,13          |
| 67,1   | 1,33278                                | 36,65          | 72,6  | 1,36739                                | 39,44          | 78,1   | 1,40321                                | 42,18          |
| 67,2   | 1,33340                                | 36,70          | 72,7  | 1,36803                                | 39,49          | 78,2   | 1,40387                                | 42,23          |
| 67,3   | 1,33402                                | 36,75          | 72,8  | 1,36867                                | 39,54          | 78,3   | 1,40453                                | 42,28          |
| 67,4   | 1,33464                                | 36,80          | 72,9  | 1,36931                                | 39,59          | 78,4   | 1,40520                                | 42,32          |
| 67,5   | 1,33526                                | 36,85          |   |  |                | 78,5   | 1,40586                                | 42,37          |
| 67,6   | 1,33588                                | 36,90          | 73,0  | 1,36995                                | 39,64          | 78,6   | 1,40652                                | 42,42          |
| 67,7   | 1,33650                                | 36,96          | 73,1  | 1,37059                                | 39,69          | 78,7   | 1,40719                                | 42,47          |
| 67,8   | 1,33712                                | 37,01          | 73,2  | 1,37124                                | 39,74          | 78,8   | 1,40785                                | 42,52          |
| 67,9   | 1,33774                                | 37,06          | 73,3  | 1,37188                                | 39,79          | 78,9   | 1,40852                                | 42,57          |
|  |  |                | 73,4  | 1,37252                                | 39,84          |  |  |                |
| 68,0   | 1,33836                                | 37,11          | 73,5  | 1,37317                                | 39,89          | 79,0   | 1,40918                                | 42,62          |
| 68,1   | 1,33899                                | 37,16          | 73,6  | 1,37381                                | 39,94          | 79,1   | 1,40985                                | 42,67          |
| 68,2   | 1,33961                                | 37,21          | 73,7  | 1,37446                                | 39,99          | 79,2   | 1,41052                                | 42,72          |
| 68,3   | 1,34023                                | 37,26          | 73,8  | 1,37510                                | 40,04          | 79,3   | 1,41118                                | 42,77          |
| 68,4   | 1,34085                                | 37,31          | 73,9  | 1,37575                                | 40,09          | 79,4   | 1,41185                                | 42,82          |

Tabelle II A. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH. 1669

| Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br><i>s</i> 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br><i>s</i> 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ | Zucker nach<br>Graden<br>BALLING<br>(BRIX)<br>Gew.-% | Spezifisches<br>Gewicht<br><i>s</i> 17,5/17,5 | Grade<br>BAUMÉ |
|--|---|----------------|--|---|----------------|--|---|----------------|
| 79,5   | 1,41252                                       | 42,87          | 82,0   | 1,42934                                       | 44,09          | 84,5   | 1,44641                                       | 45,30          |
| 79,6   | 1,41318                                       | 42,92          | 82,1   | 1,43002                                       | 44,14          | 84,6   | 1,44710                                       | 45,35          |
| 79,7   | 1,41385                                       | 42,96          | 82,2   | 1,43070                                       | 44,19          | 84,7   | 1,44779                                       | 45,40          |
| 79,8   | 1,41452                                       | 43,01          | 82,3   | 1,43137                                       | 44,24          | 84,8   | 1,44848                                       | 45,45          |
| 79,9   | 1,41519                                       | 43,06          | 82,4   | 1,43205                                       | 44,28          | 84,9   | 1,44917                                       | 45,49          |
|  |   |                | 82,5   | 1,43273                                       | 44,33          |  |   |                |
| 80,0   | 1,41586                                       | 43,11          | 82,6   | 1,43341                                       | 44,38          | 85,0   | 1,44986                                       | 45,54          |
| 80,1   | 1,41653                                       | 43,16          | 82,7   | 1,43409                                       | 44,43          | 85,1   | 1,45055                                       | 45,59          |
| 80,2   | 1,41720                                       | 43,21          | 82,8   | 1,43478                                       | 44,48          | 85,2   | 1,45124                                       | 45,64          |
| 80,3   | 1,41787                                       | 43,26          | 82,9   | 1,43546                                       | 44,53          | 85,3   | 1,45193                                       | 45,69          |
| 80,4   | 1,41854                                       | 43,31          |  |   |                | 85,4   | 1,45262                                       | 45,74          |
| 80,5   | 1,41921                                       | 43,36          | 83,0   | 1,43614                                       | 44,58          | 85,5   | 1,45331                                       | 45,78          |
| 80,6   | 1,41989                                       | 43,41          | 83,1   | 1,43682                                       | 44,62          | 85,6   | 1,45401                                       | 45,83          |
| 80,7   | 1,42056                                       | 43,45          | 83,2   | 1,43750                                       | 44,67          | 85,7   | 1,45470                                       | 45,88          |
| 80,8   | 1,42123                                       | 43,50          | 83,3   | 1,43819                                       | 44,72          | 85,8   | 1,45539                                       | 45,93          |
| 80,9   | 1,42190                                       | 43,55          | 83,4   | 1,43887                                       | 44,77          | 85,9   | 1,45609                                       | 45,98          |
|  |   |                | 83,5   | 1,43955                                       | 44,82          |  |   |                |
| 81,0   | 1,42258                                       | 43,60          | 83,6   | 1,44024                                       | 44,87          | 86,0   | 1,45678                                       | 46,02          |
| 81,1   | 1,42325                                       | 43,65          | 83,7   | 1,44092                                       | 44,91          | 86,1   | 1,45748                                       | 46,07          |
| 81,2   | 1,42393                                       | 43,70          | 83,8   | 1,44161                                       | 44,96          | 86,2   | 1,45817                                       | 46,12          |
| 81,3   | 1,42460                                       | 43,75          | 83,9   | 1,44229                                       | 45,01          | 86,3   | 1,45887                                       | 46,17          |
| 81,4   | 1,42528                                       | 43,80          |  |   |                | 86,4   | 1,45956                                       | 46,22          |
| 81,5   | 1,42595                                       | 43,85          | 84,0   | 1,44298                                       | 45,06          | 86,5   | 1,46026                                       | 46,26          |
| 81,6   | 1,42663                                       | 43,89          | 84,1   | 1,44367                                       | 45,11          | 86,6   | 1,46095                                       | 46,31          |
| 81,7   | 1,42731                                       | 43,94          | 84,2   | 1,44435                                       | 45,16          | 86,7   | 1,46165                                       | 46,36          |
| 81,8   | 1,42798                                       | 43,99          | 84,3   | 1,44504                                       | 45,21          | 86,8   | 1,46235                                       | 46,41          |
| 81,9   | 1,42866                                       | 44,04          | 84,4   | 1,44573                                       | 45,25          | 86,9   | 1,46304                                       | 46,46          |

Tabelle II A. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes wäßriger Zucker-  
lösungen aus der scheinbaren Dichte bei 15° nach K. WINDISCH (vgl. S. 837).

| Schein-<br>bare<br>Dichte<br><i>d</i> 15/15 | Zucker      |                 | Schein-<br>bare<br>Dichte<br><i>d</i> 15/15 | Zucker      |                 | Schein-<br>bare<br>Dichte<br><i>d</i> 15/15 | Zucker      |                 | Schein-<br>bare<br>Dichte<br><i>d</i> 15/15 | Zucker      |                 |
|---|-------------|-----------------|---|-------------|-----------------|---|-------------|-----------------|---|-------------|-----------------|
|   | %           | g in<br>100 ccm |   | %           | g in<br>100 ccm |   | %           | g in<br>100 ccm |   | %           | g in<br>100 ccm |
| <b>1,0000</b>                               | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>     | <b>1,0020</b>                               | <b>0,52</b> | <b>0,52</b>     | <b>1,0040</b>                               | <b>1,03</b> | <b>1,03</b>     | <b>1,0060</b>                               | <b>1,54</b> | <b>1,55</b>     |
| 1   | 0,03        | 0,03            | 1   | 0,54        | 0,54            | 1   | 1,05        | 1,05            | 1   | 1,57        | 1,57            |
| 2   | 0,05        | 0,05            | 2   | 0,57        | 0,57            | 2   | 1,08        | 1,08            | 2   | 1,59        | 1,60            |
| 3   | 0,08        | 0,08            | 3   | 0,59        | 0,59            | 3   | 1,11        | 1,11            | 3   | 1,62        | 1,63            |
| 4   | 0,10        | 0,10            | 4   | 0,62        | 0,62            | 4   | 1,13        | 1,13            | 4   | 1,64        | 1,65            |
| 5   | 0,13        | 0,13            | 5   | 0,64        | 0,64            | 5   | 1,16        | 1,16            | 5   | 1,67        | 1,68            |
| 6   | 0,15        | 0,15            | 6   | 0,67        | 0,67            | 6   | 1,18        | 1,18            | 6   | 1,69        | 1,70            |
| 7   | 0,18        | 0,18            | 7   | 0,69        | 0,69            | 7   | 1,21        | 1,21            | 7   | 1,72        | 1,73            |
| 8   | 0,21        | 0,21            | 8   | 0,72        | 0,72            | 8   | 1,23        | 1,23            | 8   | 1,75        | 1,76            |
| 9   | 0,23        | 0,23            | 9   | 0,75        | 0,75            | 9   | 1,26        | 1,26            | 9   | 1,77        | 1,78            |
| <b>1,0010</b>                               | <b>0,26</b> | <b>0,26</b>     | <b>1,0030</b>                               | <b>0,77</b> | <b>0,77</b>     | <b>1,0050</b>                               | <b>1,28</b> | <b>1,29</b>     | <b>1,0070</b>                               | <b>1,80</b> | <b>1,81</b>     |
| 1   | 0,28        | 0,28            | 1   | 0,80        | 0,80            | 1   | 1,31        | 1,32            | 1   | 1,82        | 1,83            |
| 2   | 0,31        | 0,31            | 2   | 0,82        | 0,82            | 2   | 1,34        | 1,34            | 2   | 1,85        | 1,86            |
| 3   | 0,34        | 0,34            | 3   | 0,85        | 0,85            | 3   | 1,36        | 1,37            | 3   | 1,87        | 1,88            |
| 4   | 0,36        | 0,36            | 4   | 0,87        | 0,87            | 4   | 1,39        | 1,39            | 4   | 1,90        | 1,91            |
| 5   | 0,39        | 0,39            | 5   | 0,90        | 0,90            | 5   | 1,41        | 1,42            | 5   | 1,92        | 1,94            |
| 6   | 0,41        | 0,41            | 6   | 0,93        | 0,93            | 6   | 1,44        | 1,45            | 6   | 1,95        | 1,96            |
| 7   | 0,44        | 0,44            | 7   | 0,95        | 0,95            | 7   | 1,46        | 1,47            | 7   | 1,97        | 1,99            |
| 8   | 0,46        | 0,46            | 8   | 0,98        | 0,98            | 8   | 1,49        | 1,50            | 8   | 2,00        | 2,01            |
| 9   | 0,49        | 0,49            | 9   | 1,00        | 1,00            | 9   | 1,52        | 1,52            | 9   | 2,03        | 2,04            |

1670 Tabelle IIA. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH.

| Scheinbare Dichte $\bar{d}^{15/15}$ | Zucker      |              | Scheinbare Dichte $\bar{d}^{15/15}$ | Zucker      |              | Scheinbare Dichte $\bar{d}^{15/15}$ | Zucker      |              | Scheinbare Dichte $\bar{d}^{15/15}$ | Zucker      |              |
|-------------------------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|-------------|--------------|
|                                     | %           | g in 100 ccm |                                     | %           | g in 100 ccm |                                     | %           | g in 100 ccm |                                     | %           | g in 100 ccm |
| <b>1,0080</b>                       | <b>2,05</b> | <b>2,07</b>  | <b>1,0140</b>                       | <b>3,57</b> | <b>3,62</b>  | <b>1,0200</b>                       | <b>5,07</b> | <b>5,17</b>  | <b>1,0260</b>                       | <b>6,56</b> | <b>6,72</b>  |
| 1                                   | 2,08        | 2,09         | 1                                   | 3,59        | 3,64         | 1                                   | 5,10        | 5,19         | 1                                   | 6,58        | 6,75         |
| 2                                   | 2,10        | 2,12         | 2                                   | 3,62        | 3,67         | 2                                   | 5,12        | 5,22         | 2                                   | 6,60        | 6,77         |
| 3                                   | 2,13        | 2,14         | 3                                   | 3,65        | 3,69         | 3                                   | 5,15        | 5,25         | 3                                   | 6,63        | 6,80         |
| 4                                   | 2,15        | 2,17         | 4                                   | 3,67        | 3,72         | 4                                   | 5,17        | 5,27         | 4                                   | 6,65        | 6,82         |
| 5                                   | 2,18        | 2,19         | 5                                   | 3,70        | 3,75         | 5                                   | 5,20        | 5,30         | 5                                   | 6,68        | 6,85         |
| 6                                   | 2,20        | 2,22         | 6                                   | 3,72        | 3,77         | 6                                   | 5,22        | 5,32         | 6                                   | 6,70        | 6,88         |
| 7                                   | 2,23        | 2,25         | 7                                   | 3,75        | 3,80         | 7                                   | 5,25        | 5,35         | 7                                   | 6,73        | 6,90         |
| 8                                   | 2,25        | 2,27         | 8                                   | 3,77        | 3,82         | 8                                   | 5,27        | 5,38         | 8                                   | 6,75        | 6,93         |
| 9                                   | 2,28        | 2,30         | 9                                   | 3,80        | 3,85         | 9                                   | 5,30        | 5,40         | 9                                   | 6,78        | 6,95         |
| <b>1,0090</b>                       | <b>2,31</b> | <b>2,32</b>  | <b>1,0150</b>                       | <b>3,82</b> | <b>3,87</b>  | <b>1,0210</b>                       | <b>5,32</b> | <b>5,43</b>  | <b>1,0270</b>                       | <b>6,80</b> | <b>6,98</b>  |
| 1                                   | 2,33        | 2,35         | 1                                   | 3,85        | 3,90         | 1                                   | 5,35        | 5,45         | 1                                   | 6,83        | 7,01         |
| 2                                   | 2,36        | 2,38         | 2                                   | 3,87        | 3,93         | 2                                   | 5,37        | 5,48         | 2                                   | 6,85        | 7,03         |
| 3                                   | 2,38        | 2,40         | 3                                   | 3,90        | 3,95         | 3                                   | 5,40        | 5,51         | 3                                   | 6,88        | 7,06         |
| 4                                   | 2,41        | 2,43         | 4                                   | 3,92        | 3,98         | 4                                   | 5,42        | 5,53         | 4                                   | 6,90        | 7,08         |
| 5                                   | 2,43        | 2,45         | 5                                   | 3,95        | 4,00         | 5                                   | 5,45        | 5,56         | 5                                   | 6,92        | 7,11         |
| 6                                   | 2,46        | 2,48         | 6                                   | 3,97        | 4,03         | 6                                   | 5,47        | 5,58         | 6                                   | 6,95        | 7,13         |
| 7                                   | 2,48        | 2,50         | 7                                   | 4,00        | 4,06         | 7                                   | 5,50        | 5,61         | 7                                   | 6,97        | 7,16         |
| 8                                   | 2,51        | 2,53         | 8                                   | 4,02        | 4,08         | 8                                   | 5,52        | 5,64         | 8                                   | 7,00        | 7,19         |
| 9                                   | 2,53        | 2,56         | 9                                   | 4,05        | 4,11         | 9                                   | 5,55        | 5,66         | 9                                   | 7,02        | 7,21         |
| <b>1,0100</b>                       | <b>2,56</b> | <b>2,58</b>  | <b>1,0160</b>                       | <b>4,07</b> | <b>4,13</b>  | <b>1,0220</b>                       | <b>5,57</b> | <b>5,69</b>  | <b>1,0280</b>                       | <b>7,05</b> | <b>7,24</b>  |
| 1                                   | 2,58        | 2,61         | 1                                   | 4,10        | 4,16         | 1                                   | 5,60        | 5,71         | 1                                   | 7,07        | 7,26         |
| 2                                   | 2,61        | 2,63         | 2                                   | 4,12        | 4,19         | 2                                   | 5,62        | 5,74         | 2                                   | 7,10        | 7,29         |
| 3                                   | 2,64        | 2,66         | 3                                   | 4,15        | 4,21         | 3                                   | 5,65        | 5,77         | 3                                   | 7,12        | 7,32         |
| 4                                   | 2,66        | 2,69         | 4                                   | 4,17        | 4,24         | 4                                   | 5,67        | 5,79         | 4                                   | 7,15        | 7,34         |
| 5                                   | 2,69        | 2,71         | 5                                   | 4,20        | 4,26         | 5                                   | 5,70        | 5,82         | 5                                   | 7,17        | 7,37         |
| 6                                   | 2,71        | 2,74         | 6                                   | 4,22        | 4,29         | 6                                   | 5,72        | 5,84         | 6                                   | 7,20        | 7,39         |
| 7                                   | 2,74        | 2,76         | 7                                   | 4,25        | 4,31         | 7                                   | 5,74        | 5,87         | 7                                   | 7,22        | 7,42         |
| 8                                   | 2,76        | 2,79         | 8                                   | 4,27        | 4,34         | 8                                   | 5,77        | 5,89         | 8                                   | 7,24        | 7,45         |
| 9                                   | 2,79        | 2,82         | 9                                   | 4,30        | 4,37         | 9                                   | 5,79        | 5,92         | 9                                   | 7,27        | 7,47         |
| <b>1,0110</b>                       | <b>2,81</b> | <b>2,84</b>  | <b>1,0170</b>                       | <b>4,32</b> | <b>4,39</b>  | <b>1,0230</b>                       | <b>5,82</b> | <b>5,94</b>  | <b>1,0290</b>                       | <b>7,29</b> | <b>7,50</b>  |
| 1                                   | 2,84        | 2,87         | 1                                   | 4,35        | 4,42         | 1                                   | 5,84        | 5,97         | 1                                   | 7,32        | 7,52         |
| 2                                   | 2,86        | 2,89         | 2                                   | 4,37        | 4,44         | 2                                   | 5,87        | 6,00         | 2                                   | 7,34        | 7,55         |
| 3                                   | 2,89        | 2,92         | 3                                   | 4,40        | 4,47         | 3                                   | 5,89        | 6,02         | 3                                   | 7,37        | 7,58         |
| 4                                   | 2,91        | 2,94         | 4                                   | 4,42        | 4,50         | 4                                   | 5,91        | 6,05         | 4                                   | 7,39        | 7,60         |
| 5                                   | 2,94        | 2,97         | 5                                   | 4,45        | 4,52         | 5                                   | 5,94        | 6,07         | 5                                   | 7,41        | 7,63         |
| 6                                   | 2,96        | 3,00         | 6                                   | 4,47        | 4,55         | 6                                   | 5,96        | 6,10         | 6                                   | 7,44        | 7,65         |
| 7                                   | 2,99        | 3,02         | 7                                   | 4,50        | 4,57         | 7                                   | 5,99        | 6,12         | 7                                   | 7,46        | 7,68         |
| 8                                   | 3,02        | 3,05         | 8                                   | 4,52        | 4,60         | 8                                   | 6,01        | 6,15         | 8                                   | 7,49        | 7,70         |
| 9                                   | 3,04        | 3,07         | 9                                   | 4,55        | 4,63         | 9                                   | 6,04        | 6,18         | 9                                   | 7,51        | 7,73         |
| <b>1,0120</b>                       | <b>3,07</b> | <b>3,10</b>  | <b>1,0180</b>                       | <b>4,57</b> | <b>4,65</b>  | <b>1,0240</b>                       | <b>6,06</b> | <b>6,20</b>  | <b>1,0300</b>                       | <b>7,54</b> | <b>7,76</b>  |
| 1                                   | 3,09        | 3,12         | 1                                   | 4,60        | 4,68         | 1                                   | 6,09        | 6,23         | 1                                   | 7,56        | 7,78         |
| 2                                   | 3,12        | 3,15         | 2                                   | 4,62        | 4,70         | 2                                   | 6,11        | 6,25         | 2                                   | 7,59        | 7,81         |
| 3                                   | 3,14        | 3,18         | 3                                   | 4,65        | 4,73         | 3                                   | 6,14        | 6,28         | 3                                   | 7,61        | 7,83         |
| 4                                   | 3,17        | 3,20         | 4                                   | 4,67        | 4,75         | 4                                   | 6,16        | 6,31         | 4                                   | 7,64        | 7,86         |
| 5                                   | 3,19        | 3,23         | 5                                   | 4,70        | 4,78         | 5                                   | 6,19        | 6,33         | 5                                   | 7,66        | 7,89         |
| 6                                   | 3,22        | 3,26         | 6                                   | 4,72        | 4,81         | 6                                   | 6,21        | 6,36         | 6                                   | 7,69        | 7,91         |
| 7                                   | 3,24        | 3,28         | 7                                   | 4,75        | 4,83         | 7                                   | 6,24        | 6,38         | 7                                   | 7,71        | 7,94         |
| 8                                   | 3,27        | 3,31         | 8                                   | 4,77        | 4,86         | 8                                   | 6,26        | 6,41         | 8                                   | 7,73        | 7,97         |
| 9                                   | 3,29        | 3,33         | 9                                   | 4,80        | 4,88         | 9                                   | 6,29        | 6,44         | 9                                   | 7,76        | 7,99         |
| <b>1,0130</b>                       | <b>3,32</b> | <b>3,36</b>  | <b>1,0190</b>                       | <b>4,82</b> | <b>4,91</b>  | <b>1,0250</b>                       | <b>6,31</b> | <b>6,46</b>  | <b>1,0310</b>                       | <b>7,78</b> | <b>8,02</b>  |
| 1                                   | 3,34        | 3,38         | 1                                   | 4,85        | 4,94         | 1                                   | 6,33        | 6,49         | 1                                   | 7,81        | 8,04         |
| 2                                   | 3,37        | 3,41         | 2                                   | 4,87        | 4,96         | 2                                   | 6,36        | 6,51         | 2                                   | 7,83        | 8,07         |
| 3                                   | 3,39        | 3,43         | 3                                   | 4,90        | 4,99         | 3                                   | 6,38        | 6,54         | 3                                   | 7,85        | 8,09         |
| 4                                   | 3,42        | 3,46         | 4                                   | 4,92        | 5,01         | 4                                   | 6,41        | 6,56         | 4                                   | 7,88        | 8,12         |
| 5                                   | 3,44        | 3,49         | 5                                   | 4,95        | 5,04         | 5                                   | 6,43        | 6,59         | 5                                   | 7,90        | 8,14         |
| 6                                   | 3,47        | 3,51         | 6                                   | 4,97        | 5,06         | 6                                   | 6,46        | 6,62         | 6                                   | 7,93        | 8,17         |
| 7                                   | 3,49        | 3,54         | 7                                   | 5,00        | 5,09         | 7                                   | 6,48        | 6,64         | 7                                   | 7,95        | 8,20         |
| 8                                   | 3,52        | 3,56         | 8                                   | 5,02        | 5,11         | 8                                   | 6,51        | 6,67         | 8                                   | 7,98        | 8,22         |
| 9                                   | 3,54        | 3,59         | 9                                   | 5,05        | 5,14         | 9                                   | 6,53        | 6,70         | 9                                   | 8,00        | 8,25         |

Tabelle II.A. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH. 1671

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker      |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              |
|-------------------------------|-------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                               | %           | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |
| <b>1,0320</b>                 | <b>8,02</b> | <b>8,27</b>  | <b>1,0380</b>                 | <b>9,48</b>  | <b>9,83</b>  | <b>1,0440</b>                 | <b>10,92</b> | <b>11,39</b> | <b>1,0500</b>                 | <b>12,34</b> | <b>12,95</b> |
| 1                             | 8,05        | 8,30         | 1                             | 9,50         | 9,86         | 1                             | 10,94        | 11,42        | 1                             | 12,37        | 12,97        |
| 2                             | 8,07        | 8,33         | 2                             | 9,53         | 9,88         | 2                             | 10,97        | 11,44        | 2                             | 12,39        | 13,00        |
| 3                             | 8,10        | 8,35         | 3                             | 9,55         | 9,91         | 3                             | 10,99        | 11,47        | 3                             | 12,41        | 13,03        |
| 4                             | 8,12        | 8,38         | 4                             | 9,58         | 9,93         | 4                             | 11,01        | 11,49        | 4                             | 12,44        | 13,05        |
| 5                             | 8,15        | 8,40         | 5                             | 9,60         | 9,96         | 5                             | 11,04        | 11,52        | 5                             | 12,46        | 13,08        |
| 6                             | 8,17        | 8,43         | 6                             | 9,62         | 9,99         | 6                             | 11,06        | 11,55        | 6                             | 12,48        | 13,10        |
| 7                             | 8,20        | 8,46         | 7                             | 9,65         | 10,01        | 7                             | 11,09        | 11,57        | 7                             | 12,51        | 13,13        |
| 8                             | 8,22        | 8,48         | 8                             | 9,67         | 10,04        | 8                             | 11,11        | 11,60        | 8                             | 12,53        | 13,15        |
| 9                             | 8,24        | 8,51         | 9                             | 9,70         | 10,06        | 9                             | 11,13        | 11,62        | 9                             | 12,55        | 13,18        |
| <b>1,0330</b>                 | <b>8,27</b> | <b>8,53</b>  | <b>1,0390</b>                 | <b>9,72</b>  | <b>10,09</b> | <b>1,0450</b>                 | <b>11,16</b> | <b>11,65</b> | <b>1,0510</b>                 | <b>12,58</b> | <b>13,21</b> |
| 1                             | 8,29        | 8,56         | 1                             | 9,74         | 10,11        | 1                             | 11,18        | 11,68        | 1                             | 12,60        | 13,23        |
| 2                             | 8,32        | 8,59         | 2                             | 9,77         | 10,14        | 2                             | 11,20        | 11,70        | 2                             | 12,63        | 13,26        |
| 3                             | 8,34        | 8,61         | 3                             | 9,79         | 10,17        | 3                             | 11,23        | 11,73        | 3                             | 12,65        | 13,29        |
| 4                             | 8,37        | 8,64         | 4                             | 9,82         | 10,19        | 4                             | 11,25        | 11,75        | 4                             | 12,67        | 13,31        |
| 5                             | 8,39        | 8,66         | 5                             | 9,84         | 10,22        | 5                             | 11,28        | 11,78        | 5                             | 12,70        | 13,34        |
| 6                             | 8,41        | 8,69         | 6                             | 9,86         | 10,25        | 6                             | 11,30        | 11,81        | 6                             | 12,72        | 13,36        |
| 7                             | 8,44        | 8,72         | 7                             | 9,89         | 10,27        | 7                             | 11,32        | 11,83        | 7                             | 12,74        | 13,39        |
| 8                             | 8,46        | 8,74         | 8                             | 9,91         | 10,30        | 8                             | 11,35        | 11,86        | 8                             | 12,77        | 13,42        |
| 9                             | 8,49        | 8,77         | 9                             | 9,94         | 10,32        | 9                             | 11,37        | 11,88        | 9                             | 12,79        | 13,44        |
| <b>1,0340</b>                 | <b>8,51</b> | <b>8,79</b>  | <b>1,0400</b>                 | <b>9,96</b>  | <b>10,35</b> | <b>1,0460</b>                 | <b>11,40</b> | <b>11,91</b> | <b>1,0520</b>                 | <b>12,81</b> | <b>13,47</b> |
| 1                             | 8,54        | 8,82         | 1                             | 9,98         | 10,37        | 1                             | 11,42        | 11,94        | 1                             | 12,84        | 13,49        |
| 2                             | 8,56        | 8,85         | 2                             | 10,01        | 10,40        | 2                             | 11,44        | 11,96        | 2                             | 12,86        | 13,52        |
| 3                             | 8,59        | 8,87         | 3                             | 10,03        | 10,43        | 3                             | 11,47        | 11,99        | 3                             | 12,88        | 13,55        |
| 4                             | 8,61        | 8,90         | 4                             | 10,06        | 10,45        | 4                             | 11,49        | 12,01        | 4                             | 12,91        | 13,57        |
| 5                             | 8,63        | 8,92         | 5                             | 10,08        | 10,48        | 5                             | 11,51        | 12,04        | 5                             | 12,93        | 13,60        |
| 6                             | 8,66        | 8,95         | 6                             | 10,10        | 10,51        | 6                             | 11,54        | 12,06        | 6                             | 12,95        | 13,62        |
| 7                             | 8,68        | 8,97         | 7                             | 10,13        | 10,53        | 7                             | 11,56        | 12,09        | 7                             | 12,98        | 13,65        |
| 8                             | 8,71        | 9,00         | 8                             | 10,15        | 10,56        | 8                             | 11,58        | 12,12        | 8                             | 13,00        | 13,68        |
| 9                             | 8,73        | 9,03         | 9                             | 10,18        | 10,58        | 9                             | 11,61        | 12,14        | 9                             | 13,03        | 13,70        |
| <b>1,0350</b>                 | <b>8,75</b> | <b>9,05</b>  | <b>1,0410</b>                 | <b>10,20</b> | <b>10,61</b> | <b>1,0470</b>                 | <b>11,63</b> | <b>12,17</b> | <b>1,0530</b>                 | <b>13,05</b> | <b>13,73</b> |
| 1                             | 8,78        | 9,08         | 1                             | 10,22        | 10,63        | 1                             | 11,65        | 12,19        | 1                             | 13,07        | 13,75        |
| 2                             | 8,80        | 9,10         | 2                             | 10,25        | 10,66        | 2                             | 11,68        | 12,22        | 2                             | 13,10        | 13,78        |
| 3                             | 8,83        | 9,13         | 3                             | 10,27        | 10,69        | 3                             | 11,70        | 12,25        | 3                             | 13,12        | 13,80        |
| 4                             | 8,85        | 9,16         | 4                             | 10,30        | 10,71        | 4                             | 11,73        | 12,27        | 4                             | 13,14        | 13,83        |
| 5                             | 8,88        | 9,18         | 5                             | 10,32        | 10,74        | 5                             | 11,75        | 12,30        | 5                             | 13,17        | 13,86        |
| 6                             | 8,90        | 9,21         | 6                             | 10,34        | 10,76        | 6                             | 11,77        | 12,32        | 6                             | 13,19        | 13,89        |
| 7                             | 8,92        | 9,23         | 7                             | 10,37        | 10,79        | 7                             | 11,80        | 12,35        | 7                             | 13,21        | 13,91        |
| 8                             | 8,95        | 9,26         | 8                             | 10,39        | 10,82        | 8                             | 11,82        | 12,38        | 8                             | 13,24        | 13,94        |
| 9                             | 8,97        | 9,29         | 9                             | 10,42        | 10,84        | 9                             | 11,85        | 12,40        | 9                             | 13,26        | 13,96        |
| <b>1,0360</b>                 | <b>9,00</b> | <b>9,31</b>  | <b>1,0420</b>                 | <b>10,44</b> | <b>10,87</b> | <b>1,0480</b>                 | <b>11,87</b> | <b>12,43</b> | <b>1,0540</b>                 | <b>13,28</b> | <b>13,99</b> |
| 1                             | 9,02        | 9,34         | 1                             | 10,46        | 10,90        | 1                             | 11,89        | 12,45        | 1                             | 13,31        | 14,01        |
| 2                             | 9,04        | 9,36         | 2                             | 10,49        | 10,92        | 2                             | 11,92        | 12,48        | 2                             | 13,33        | 14,04        |
| 3                             | 9,07        | 9,39         | 3                             | 10,51        | 10,95        | 3                             | 11,94        | 11,51        | 3                             | 13,35        | 14,07        |
| 4                             | 9,09        | 9,42         | 4                             | 10,54        | 10,97        | 4                             | 11,96        | 12,53        | 4                             | 13,38        | 14,09        |
| 5                             | 9,12        | 9,44         | 5                             | 10,56        | 11,00        | 5                             | 11,99        | 12,56        | 5                             | 12,40        | 14,12        |
| 6                             | 9,14        | 9,47         | 6                             | 10,58        | 11,03        | 6                             | 12,01        | 12,58        | 6                             | 13,42        | 14,14        |
| 7                             | 9,17        | 9,49         | 7                             | 10,61        | 11,05        | 7                             | 12,03        | 12,61        | 7                             | 13,45        | 14,17        |
| 8                             | 9,19        | 9,52         | 8                             | 10,63        | 11,08        | 8                             | 12,06        | 12,64        | 8                             | 13,47        | 14,20        |
| 9                             | 9,21        | 9,55         | 9                             | 10,65        | 11,10        | 9                             | 12,08        | 12,66        | 9                             | 13,50        | 14,22        |
| <b>1,0370</b>                 | <b>9,24</b> | <b>9,57</b>  | <b>1,0430</b>                 | <b>10,68</b> | <b>11,13</b> | <b>1,0490</b>                 | <b>12,10</b> | <b>12,69</b> | <b>0,0550</b>                 | <b>13,52</b> | <b>14,25</b> |
| 1                             | 9,26        | 9,60         | 1                             | 10,70        | 11,15        | 1                             | 12,13        | 12,71        | 1                             | 13,54        | 14,28        |
| 2                             | 9,29        | 9,62         | 2                             | 10,73        | 11,18        | 2                             | 12,15        | 12,74        | 2                             | 13,57        | 14,30        |
| 3                             | 9,31        | 9,65         | 3                             | 10,75        | 11,21        | 3                             | 12,18        | 12,77        | 3                             | 13,59        | 14,33        |
| 4                             | 9,33        | 9,68         | 4                             | 10,77        | 11,23        | 4                             | 12,20        | 12,79        | 4                             | 13,61        | 14,35        |
| 5                             | 9,36        | 9,70         | 5                             | 10,80        | 11,26        | 5                             | 12,22        | 12,82        | 5                             | 13,63        | 14,38        |
| 6                             | 9,38        | 9,73         | 6                             | 10,82        | 11,28        | 6                             | 12,25        | 12,84        | 6                             | 13,66        | 14,41        |
| 7                             | 9,41        | 9,75         | 7                             | 10,85        | 11,31        | 7                             | 12,27        | 12,87        | 7                             | 13,68        | 14,43        |
| 8                             | 9,43        | 9,78         | 8                             | 10,87        | 11,34        | 8                             | 12,30        | 12,90        | 8                             | 13,70        | 14,46        |
| 9                             | 9,45        | 9,80         | 9                             | 10,90        | 11,36        | 9                             | 12,32        | 12,92        | 9                             | 13,73        | 14,48        |



1672 Tabelle II.A. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH.

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |
| <b>1,0560</b>                 | <b>13,75</b> | <b>14,51</b> | <b>1,0620</b>                 | <b>15,15</b> | <b>16,07</b> | <b>1,0680</b>                 | <b>16,53</b> | <b>17,64</b> | <b>1,0740</b>                 | <b>17,90</b> | <b>19,21</b> |
| 1                             | 13,78        | 14,54        | 1                             | 15,17        | 16,10        | 1                             | 16,55        | 17,67        | 1                             | 17,92        | 19,23        |
| 2                             | 13,80        | 14,56        | 2                             | 15,20        | 16,13        | 2                             | 16,58        | 17,69        | 2                             | 17,95        | 19,26        |
| 3                             | 13,82        | 14,59        | 3                             | 15,22        | 16,15        | 3                             | 16,60        | 17,72        | 3                             | 17,97        | 19,29        |
| 4                             | 13,85        | 14,61        | 4                             | 15,24        | 16,18        | 4                             | 16,62        | 17,75        | 4                             | 17,99        | 19,31        |
| 5                             | 13,87        | 14,64        | 5                             | 15,27        | 16,21        | 5                             | 16,65        | 17,77        | 5                             | 18,01        | 19,34        |
| 6                             | 13,89        | 14,67        | 6                             | 15,29        | 16,23        | 6                             | 16,67        | 17,80        | 6                             | 18,04        | 19,37        |
| 7                             | 13,92        | 14,69        | 7                             | 15,31        | 16,26        | 7                             | 16,69        | 17,83        | 7                             | 18,06        | 19,39        |
| 8                             | 13,94        | 14,72        | 8                             | 15,33        | 16,28        | 8                             | 16,72        | 17,85        | 8                             | 18,08        | 19,42        |
| 9                             | 13,96        | 14,74        | 9                             | 15,36        | 16,31        | 9                             | 16,74        | 17,88        | 9                             | 18,10        | 19,44        |
| <b>1,0570</b>                 | <b>13,99</b> | <b>14,77</b> | <b>1,0630</b>                 | <b>15,38</b> | <b>16,33</b> | <b>1,0690</b>                 | <b>16,76</b> | <b>17,90</b> | <b>1,0750</b>                 | <b>18,13</b> | <b>19,47</b> |
| 1                             | 14,01        | 14,80        | 1                             | 15,40        | 16,36        | 1                             | 16,78        | 17,93        | 1                             | 18,15        | 19,50        |
| 2                             | 14,03        | 14,82        | 2                             | 15,43        | 16,39        | 2                             | 16,81        | 17,95        | 2                             | 18,17        | 19,52        |
| 3                             | 14,06        | 14,85        | 3                             | 15,45        | 16,41        | 3                             | 16,83        | 17,98        | 3                             | 18,20        | 19,55        |
| 4                             | 14,08        | 14,87        | 4                             | 15,47        | 16,44        | 4                             | 16,85        | 18,01        | 4                             | 18,22        | 19,58        |
| 5                             | 14,10        | 14,90        | 5                             | 15,50        | 16,47        | 5                             | 16,88        | 18,03        | 5                             | 18,24        | 19,60        |
| 6                             | 14,13        | 14,93        | 6                             | 15,52        | 16,49        | 6                             | 16,90        | 18,06        | 6                             | 18,26        | 19,63        |
| 7                             | 14,15        | 14,95        | 7                             | 15,54        | 16,52        | 7                             | 16,92        | 18,08        | 7                             | 18,29        | 19,65        |
| 8                             | 14,17        | 14,98        | 8                             | 15,57        | 16,54        | 8                             | 16,94        | 18,11        | 8                             | 18,31        | 19,68        |
| 9                             | 14,20        | 15,00        | 9                             | 15,59        | 16,57        | 9                             | 16,97        | 18,14        | 9                             | 18,33        | 19,71        |
| <b>1,0580</b>                 | <b>14,22</b> | <b>15,03</b> | <b>1,0640</b>                 | <b>15,61</b> | <b>16,60</b> | <b>1,0700</b>                 | <b>16,99</b> | <b>18,16</b> | <b>1,0760</b>                 | <b>18,35</b> | <b>19,73</b> |
| 1                             | 14,24        | 15,06        | 1                             | 15,63        | 16,62        | 1                             | 17,01        | 18,19        | 1                             | 18,38        | 19,76        |
| 2                             | 14,27        | 15,08        | 2                             | 15,66        | 16,65        | 2                             | 17,03        | 18,22        | 2                             | 18,40        | 19,79        |
| 3                             | 14,29        | 15,11        | 3                             | 15,68        | 16,68        | 3                             | 17,06        | 18,24        | 3                             | 18,42        | 19,81        |
| 4                             | 14,31        | 15,14        | 4                             | 15,70        | 16,70        | 4                             | 17,08        | 18,27        | 4                             | 18,45        | 19,84        |
| 5                             | 14,34        | 15,16        | 5                             | 15,73        | 16,73        | 5                             | 17,10        | 18,30        | 5                             | 18,47        | 19,86        |
| 6                             | 14,36        | 15,09        | 6                             | 15,75        | 16,75        | 6                             | 17,13        | 18,32        | 6                             | 18,49        | 19,89        |
| 7                             | 13,38        | 15,22        | 7                             | 15,77        | 16,78        | 7                             | 17,15        | 18,35        | 7                             | 18,51        | 19,92        |
| 8                             | 14,41        | 15,24        | 8                             | 15,80        | 16,80        | 8                             | 17,17        | 18,37        | 8                             | 18,54        | 19,94        |
| 9                             | 14,43        | 15,27        | 9                             | 15,82        | 16,83        | 9                             | 17,20        | 18,40        | 9                             | 18,56        | 19,97        |
| <b>1,0590</b>                 | <b>14,45</b> | <b>15,29</b> | <b>1,0650</b>                 | <b>15,84</b> | <b>16,86</b> | <b>1,0710</b>                 | <b>17,22</b> | <b>18,43</b> | <b>1,0770</b>                 | <b>18,58</b> | <b>20,00</b> |
| 1                             | 14,48        | 15,32        | 1                             | 15,87        | 16,88        | 1                             | 17,24        | 18,45        | 1                             | 18,60        | 20,02        |
| 2                             | 14,50        | 15,35        | 2                             | 15,89        | 16,91        | 2                             | 17,26        | 18,48        | 2                             | 18,63        | 20,05        |
| 3                             | 14,52        | 15,37        | 3                             | 15,91        | 16,94        | 3                             | 17,29        | 18,50        | 3                             | 18,65        | 20,07        |
| 4                             | 14,55        | 15,40        | 4                             | 15,93        | 16,96        | 4                             | 17,31        | 18,53        | 4                             | 18,67        | 20,10        |
| 5                             | 14,57        | 15,42        | 5                             | 15,96        | 16,99        | 5                             | 17,33        | 18,56        | 5                             | 18,69        | 20,12        |
| 6                             | 14,59        | 15,45        | 6                             | 15,98        | 17,01        | 6                             | 17,35        | 18,58        | 6                             | 18,72        | 20,15        |
| 7                             | 14,62        | 15,48        | 7                             | 16,00        | 17,04        | 7                             | 17,38        | 18,61        | 7                             | 18,74        | 20,18        |
| 8                             | 14,64        | 15,50        | 8                             | 16,03        | 17,07        | 8                             | 17,40        | 18,63        | 8                             | 18,76        | 20,20        |
| 9                             | 14,66        | 15,53        | 9                             | 16,05        | 17,09        | 9                             | 17,42        | 18,66        | 9                             | 18,78        | 20,23        |
| <b>1,0600</b>                 | <b>14,69</b> | <b>15,55</b> | <b>1,0660</b>                 | <b>16,07</b> | <b>17,12</b> | <b>1,0720</b>                 | <b>17,45</b> | <b>18,69</b> | <b>1,0780</b>                 | <b>18,81</b> | <b>20,26</b> |
| 1                             | 14,71        | 15,58        | 1                             | 16,10        | 17,14        | 1                             | 17,47        | 18,71        | 1                             | 18,83        | 20,28        |
| 2                             | 14,73        | 15,61        | 2                             | 16,12        | 17,17        | 2                             | 17,49        | 18,74        | 2                             | 18,85        | 20,31        |
| 3                             | 14,76        | 15,63        | 3                             | 16,14        | 17,20        | 3                             | 17,51        | 18,76        | 3                             | 18,88        | 20,34        |
| 4                             | 14,78        | 15,66        | 4                             | 16,16        | 17,22        | 4                             | 17,54        | 18,79        | 4                             | 18,90        | 20,36        |
| 5                             | 14,80        | 15,68        | 5                             | 16,19        | 17,25        | 5                             | 17,56        | 18,82        | 5                             | 18,92        | 20,39        |
| 6                             | 14,83        | 15,71        | 6                             | 16,21        | 17,27        | 6                             | 17,58        | 18,84        | 6                             | 18,94        | 20,41        |
| 7                             | 14,85        | 15,74        | 7                             | 16,23        | 17,30        | 7                             | 17,61        | 18,87        | 7                             | 18,97        | 20,44        |
| 8                             | 14,87        | 15,76        | 8                             | 16,26        | 17,33        | 8                             | 17,63        | 18,90        | 8                             | 18,99        | 20,47        |
| 9                             | 14,89        | 15,79        | 9                             | 16,28        | 17,35        | 9                             | 17,65        | 18,92        | 9                             | 19,01        | 20,49        |
| <b>1,0610</b>                 | <b>14,92</b> | <b>15,81</b> | <b>1,0670</b>                 | <b>16,30</b> | <b>17,38</b> | <b>1,0730</b>                 | <b>17,68</b> | <b>18,95</b> | <b>1,0790</b>                 | <b>19,03</b> | <b>20,52</b> |
| 1                             | 14,94        | 15,84        | 1                             | 16,33        | 17,41        | 1                             | 17,70        | 18,97        | 1                             | 19,06        | 20,55        |
| 2                             | 14,96        | 15,87        | 2                             | 16,35        | 17,43        | 2                             | 17,72        | 19,00        | 2                             | 19,08        | 20,57        |
| 3                             | 14,99        | 15,89        | 3                             | 16,37        | 17,46        | 3                             | 17,74        | 19,03        | 3                             | 19,10        | 20,60        |
| 4                             | 15,01        | 15,92        | 4                             | 16,39        | 17,48        | 4                             | 17,76        | 19,05        | 4                             | 19,12        | 20,62        |
| 5                             | 15,03        | 15,94        | 5                             | 16,42        | 17,51        | 5                             | 17,79        | 19,08        | 5                             | 19,15        | 20,65        |
| 6                             | 15,06        | 15,97        | 6                             | 16,44        | 17,54        | 6                             | 17,81        | 19,10        | 6                             | 19,17        | 20,68        |
| 7                             | 15,08        | 16,00        | 7                             | 16,46        | 17,56        | 7                             | 17,83        | 19,13        | 7                             | 19,19        | 20,70        |
| 8                             | 15,10        | 16,02        | 8                             | 16,49        | 17,59        | 8                             | 17,85        | 19,16        | 8                             | 19,21        | 20,73        |
| 9                             | 15,13        | 16,04        | 9                             | 16,51        | 17,62        | 9                             | 17,88        | 19,18        | 9                             | 19,24        | 20,75        |

Tabelle II A. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH. 1673

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |
| <b>1,0800</b>                 | <b>19,26</b> | <b>20,78</b> | <b>1,0860</b>                 | <b>20,60</b> | <b>22,36</b> | <b>1,0920</b>                 | <b>21,94</b> | <b>23,93</b> | <b>1,0980</b>                 | <b>23,25</b> | <b>25,51</b> |
| 1                             | 19,28        | 20,81        | 1                             | 20,63        | 22,38        | 1                             | 21,96        | 23,96        | 1                             | 23,28        | 25,54        |
| 2                             | 19,30        | 20,83        | 2                             | 20,65        | 22,41        | 2                             | 21,98        | 23,99        | 2                             | 23,30        | 25,56        |
| 3                             | 19,33        | 20,86        | 3                             | 20,67        | 22,43        | 3                             | 22,00        | 24,01        | 3                             | 23,32        | 25,59        |
| 4                             | 19,35        | 20,89        | 4                             | 20,69        | 22,46        | 4                             | 22,02        | 24,04        | 4                             | 23,34        | 25,62        |
| 5                             | 19,37        | 20,91        | 5                             | 20,72        | 22,49        | 5                             | 22,05        | 24,07        | 5                             | 23,36        | 25,64        |
| 6                             | 19,39        | 20,94        | 6                             | 20,74        | 22,51        | 6                             | 22,07        | 24,09        | 6                             | 23,39        | 25,67        |
| 7                             | 19,42        | 20,96        | 7                             | 20,76        | 22,54        | 7                             | 22,09        | 24,12        | 7                             | 23,41        | 25,70        |
| 8                             | 19,44        | 20,99        | 8                             | 20,78        | 22,57        | 8                             | 22,11        | 24,14        | 8                             | 23,43        | 25,72        |
| 9                             | 19,46        | 21,02        | 9                             | 20,80        | 22,59        | 9                             | 22,13        | 24,17        | 9                             | 23,45        | 25,75        |
| <b>1,0810</b>                 | <b>19,48</b> | <b>21,04</b> | <b>1,0870</b>                 | <b>20,83</b> | <b>22,62</b> | <b>1,0930</b>                 | <b>22,16</b> | <b>24,20</b> | <b>1,0990</b>                 | <b>23,47</b> | <b>25,78</b> |
| 1                             | 19,50        | 21,07        | 1                             | 20,85        | 22,65        | 1                             | 22,18        | 24,22        | 1                             | 23,50        | 25,80        |
| 2                             | 19,53        | 21,10        | 2                             | 20,87        | 22,67        | 2                             | 22,20        | 24,25        | 2                             | 23,52        | 25,83        |
| 3                             | 19,55        | 21,12        | 3                             | 20,89        | 22,70        | 3                             | 22,22        | 24,27        | 3                             | 23,54        | 25,85        |
| 4                             | 19,57        | 21,15        | 4                             | 20,92        | 22,72        | 4                             | 22,24        | 24,30        | 4                             | 23,56        | 25,88        |
| 5                             | 19,60        | 21,17        | 5                             | 20,94        | 22,75        | 5                             | 22,27        | 24,33        | 5                             | 23,58        | 25,91        |
| 6                             | 19,62        | 21,20        | 6                             | 20,96        | 22,78        | 6                             | 22,29        | 24,35        | 6                             | 23,60        | 25,93        |
| 7                             | 19,64        | 21,23        | 7                             | 20,98        | 22,80        | 7                             | 22,31        | 24,38        | 7                             | 23,63        | 25,96        |
| 8                             | 19,66        | 21,25        | 8                             | 21,00        | 22,83        | 8                             | 22,33        | 24,41        | 8                             | 23,65        | 25,99        |
| 9                             | 19,68        | 21,28        | 9                             | 21,03        | 22,86        | 9                             | 22,36        | 24,43        | 9                             | 23,67        | 26,01        |
| <b>1,0820</b>                 | <b>19,71</b> | <b>21,31</b> | <b>1,0880</b>                 | <b>21,05</b> | <b>22,88</b> | <b>1,0940</b>                 | <b>22,38</b> | <b>24,46</b> | <b>1,1000</b>                 | <b>23,69</b> | <b>26,04</b> |
| 1                             | 19,73        | 21,33        | 1                             | 21,07        | 22,91        | 1                             | 22,40        | 24,49        | 1                             | 23,71        | 26,06        |
| 2                             | 19,75        | 21,36        | 2                             | 21,09        | 22,93        | 2                             | 22,42        | 24,51        | 2                             | 23,73        | 26,09        |
| 3                             | 19,78        | 21,38        | 3                             | 21,12        | 22,96        | 3                             | 22,44        | 24,54        | 3                             | 23,76        | 26,12        |
| 4                             | 19,80        | 21,41        | 4                             | 21,14        | 22,99        | 4                             | 22,47        | 24,57        | 4                             | 23,78        | 26,14        |
| 5                             | 19,82        | 21,44        | 5                             | 21,16        | 23,01        | 5                             | 22,49        | 24,59        | 5                             | 23,80        | 26,17        |
| 6                             | 19,84        | 21,46        | 6                             | 21,18        | 23,04        | 6                             | 22,51        | 24,62        | 6                             | 23,82        | 26,20        |
| 7                             | 19,86        | 21,49        | 7                             | 21,20        | 23,07        | 7                             | 22,53        | 24,64        | 7                             | 23,84        | 26,22        |
| 8                             | 19,89        | 21,52        | 8                             | 21,23        | 23,09        | 8                             | 22,55        | 24,67        | 8                             | 23,87        | 26,25        |
| 9                             | 19,91        | 21,54        | 9                             | 21,25        | 23,12        | 9                             | 22,58        | 24,70        | 9                             | 23,89        | 26,27        |
| <b>1,0830</b>                 | <b>19,93</b> | <b>21,57</b> | <b>1,0890</b>                 | <b>21,27</b> | <b>23,14</b> | <b>1,0950</b>                 | <b>22,60</b> | <b>24,72</b> | <b>1,1010</b>                 | <b>23,91</b> | <b>26,30</b> |
| 1                             | 19,95        | 21,59        | 1                             | 21,29        | 23,17        | 1                             | 22,62        | 24,75        | 1                             | 23,93        | 26,33        |
| 2                             | 19,98        | 21,62        | 2                             | 21,32        | 23,20        | 2                             | 22,64        | 24,78        | 2                             | 23,95        | 26,35        |
| 3                             | 20,00        | 21,65        | 3                             | 21,34        | 23,22        | 3                             | 22,66        | 24,80        | 3                             | 23,97        | 26,38        |
| 4                             | 20,02        | 21,67        | 4                             | 21,36        | 23,25        | 4                             | 22,68        | 24,83        | 4                             | 24,00        | 26,41        |
| 5                             | 20,04        | 21,70        | 5                             | 21,38        | 23,28        | 5                             | 22,71        | 24,85        | 5                             | 24,02        | 26,43        |
| 6                             | 20,07        | 21,73        | 6                             | 21,40        | 23,30        | 6                             | 22,73        | 24,88        | 6                             | 24,04        | 26,46        |
| 7                             | 20,09        | 21,75        | 7                             | 21,43        | 23,33        | 7                             | 22,75        | 24,91        | 7                             | 24,06        | 26,49        |
| 8                             | 20,11        | 21,78        | 8                             | 21,45        | 23,35        | 8                             | 22,77        | 24,93        | 8                             | 24,08        | 26,51        |
| 9                             | 20,13        | 21,80        | 9                             | 21,47        | 23,38        | 9                             | 22,80        | 24,96        | 9                             | 24,10        | 26,54        |
| <b>1,0840</b>                 | <b>20,16</b> | <b>21,83</b> | <b>1,0900</b>                 | <b>21,49</b> | <b>23,41</b> | <b>1,0960</b>                 | <b>22,82</b> | <b>24,99</b> | <b>1,1020</b>                 | <b>24,13</b> | <b>26,56</b> |
| 1                             | 20,18        | 21,86        | 1                             | 21,52        | 23,43        | 1                             | 22,84        | 25,01        | 1                             | 24,15        | 26,59        |
| 2                             | 20,20        | 21,88        | 2                             | 21,54        | 23,46        | 2                             | 22,86        | 25,04        | 2                             | 24,17        | 26,62        |
| 3                             | 20,22        | 21,91        | 3                             | 21,56        | 23,49        | 3                             | 22,88        | 25,07        | 3                             | 24,19        | 26,64        |
| 4                             | 20,25        | 21,94        | 4                             | 21,58        | 23,51        | 4                             | 22,90        | 25,09        | 4                             | 24,21        | 26,67        |
| 5                             | 20,27        | 21,96        | 5                             | 21,60        | 23,54        | 5                             | 22,93        | 25,12        | 5                             | 24,23        | 26,70        |
| 6                             | 20,29        | 21,99        | 6                             | 21,63        | 23,57        | 6                             | 22,95        | 25,14        | 6                             | 24,26        | 26,72        |
| 7                             | 20,31        | 22,02        | 7                             | 21,65        | 23,59        | 7                             | 22,97        | 25,17        | 7                             | 24,28        | 26,75        |
| 8                             | 20,34        | 22,04        | 8                             | 21,67        | 23,62        | 8                             | 22,99        | 25,20        | 8                             | 24,30        | 26,78        |
| 9                             | 20,36        | 22,07        | 9                             | 21,69        | 23,65        | 9                             | 23,01        | 25,22        | 9                             | 24,32        | 26,80        |
| <b>1,0850</b>                 | <b>20,38</b> | <b>22,09</b> | <b>1,0910</b>                 | <b>21,72</b> | <b>23,67</b> | <b>1,0970</b>                 | <b>23,04</b> | <b>25,25</b> | <b>1,1030</b>                 | <b>24,34</b> | <b>26,83</b> |
| 1                             | 20,40        | 22,12        | 1                             | 21,74        | 23,70        | 1                             | 23,06        | 25,28        | 1                             | 24,37        | 26,85        |
| 2                             | 20,42        | 22,15        | 2                             | 21,76        | 23,72        | 2                             | 23,08        | 25,30        | 2                             | 24,39        | 26,88        |
| 3                             | 20,45        | 22,17        | 3                             | 21,78        | 23,75        | 3                             | 23,10        | 25,33        | 3                             | 24,41        | 26,91        |
| 4                             | 20,47        | 22,20        | 4                             | 21,80        | 23,77        | 4                             | 23,12        | 25,36        | 4                             | 24,43        | 26,93        |
| 5                             | 20,49        | 22,22        | 5                             | 21,82        | 23,80        | 5                             | 23,15        | 25,38        | 5                             | 24,45        | 26,96        |
| 6                             | 20,51        | 22,25        | 6                             | 21,85        | 23,83        | 6                             | 23,17        | 25,41        | 6                             | 24,47        | 26,99        |
| 7                             | 20,54        | 22,28        | 7                             | 21,87        | 23,85        | 7                             | 23,19        | 25,43        | 7                             | 24,50        | 27,01        |
| 8                             | 20,56        | 22,30        | 8                             | 21,89        | 23,88        | 8                             | 23,21        | 25,46        | 8                             | 24,52        | 27,04        |
| 9                             | 20,58        | 22,33        | 9                             | 21,91        | 23,91        | 9                             | 23,23        | 25,49        | 9                             | 24,54        | 27,07        |

1674 Tabelle IIA. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH.

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |
| <b>1,1040</b>                 | <b>24,56</b> | <b>27,09</b> | <b>1,1100</b>                 | <b>25,85</b> | <b>28,67</b> | <b>1,1160</b>                 | <b>27,13</b> | <b>30,26</b> | <b>1,1220</b>                 | <b>28,40</b> | <b>31,84</b> |
| 1                             | 24,58        | 27,12        | 1                             | 25,87        | 28,70        | 1                             | 27,16        | 30,28        | 1                             | 28,43        | 31,87        |
| 2                             | 24,60        | 27,15        | 2                             | 25,90        | 28,73        | 2                             | 27,18        | 30,31        | 2                             | 28,45        | 31,90        |
| 3                             | 24,63        | 27,17        | 3                             | 25,92        | 28,75        | 3                             | 27,20        | 30,34        | 3                             | 28,47        | 31,92        |
| 4                             | 24,65        | 27,20        | 4                             | 25,94        | 28,78        | 4                             | 27,22        | 30,36        | 4                             | 28,49        | 31,95        |
| 5                             | 24,67        | 27,22        | 5                             | 25,96        | 28,81        | 5                             | 27,24        | 30,39        | 5                             | 28,51        | 31,97        |
| 6                             | 24,69        | 27,25        | 6                             | 25,98        | 28,83        | 6                             | 27,26        | 30,41        | 6                             | 28,53        | 32,00        |
| 7                             | 24,71        | 27,27        | 7                             | 26,00        | 28,86        | 7                             | 27,28        | 30,44        | 7                             | 28,55        | 32,03        |
| 8                             | 24,73        | 27,30        | 8                             | 26,03        | 28,88        | 8                             | 27,30        | 30,47        | 8                             | 28,57        | 32,05        |
| 9                             | 24,75        | 27,33        | 9                             | 26,05        | 28,91        | 9                             | 27,33        | 30,49        | 9                             | 28,59        | 32,08        |
| <b>1,1050</b>                 | <b>24,78</b> | <b>27,35</b> | <b>1,1110</b>                 | <b>26,07</b> | <b>28,94</b> | <b>1,1170</b>                 | <b>27,35</b> | <b>30,52</b> | <b>1,1230</b>                 | <b>28,61</b> | <b>32,11</b> |
| 1                             | 24,80        | 27,38        | 1                             | 26,09        | 28,96        | 1                             | 27,37        | 30,55        | 1                             | 28,64        | 32,13        |
| 2                             | 24,82        | 27,41        | 2                             | 26,11        | 28,99        | 2                             | 27,39        | 30,57        | 2                             | 28,66        | 32,16        |
| 3                             | 24,84        | 27,43        | 3                             | 26,13        | 29,02        | 3                             | 27,41        | 30,60        | 3                             | 28,68        | 32,19        |
| 4                             | 24,86        | 27,46        | 4                             | 26,15        | 29,04        | 4                             | 27,43        | 30,63        | 4                             | 28,70        | 32,21        |
| 5                             | 24,88        | 27,49        | 5                             | 26,17        | 29,07        | 5                             | 27,45        | 30,65        | 5                             | 28,72        | 32,24        |
| 6                             | 24,91        | 27,51        | 6                             | 26,20        | 29,09        | 6                             | 27,47        | 30,68        | 6                             | 28,74        | 32,26        |
| 7                             | 24,93        | 27,54        | 7                             | 26,22        | 29,12        | 7                             | 27,50        | 30,71        | 7                             | 28,76        | 32,29        |
| 8                             | 24,95        | 27,57        | 8                             | 26,24        | 29,15        | 8                             | 27,52        | 30,73        | 8                             | 28,78        | 32,32        |
| 9                             | 24,97        | 27,59        | 9                             | 26,26        | 29,17        | 9                             | 27,54        | 30,76        | 9                             | 28,80        | 32,34        |
| <b>1,1060</b>                 | <b>24,99</b> | <b>27,62</b> | <b>1,1120</b>                 | <b>26,28</b> | <b>29,20</b> | <b>1,1180</b>                 | <b>27,56</b> | <b>30,79</b> | <b>1,1240</b>                 | <b>28,82</b> | <b>32,37</b> |
| 1                             | 25,01        | 27,65        | 1                             | 26,30        | 29,23        | 1                             | 27,58        | 30,81        | 1                             | 28,84        | 32,40        |
| 2                             | 25,04        | 27,67        | 2                             | 26,32        | 29,25        | 2                             | 27,60        | 30,84        | 2                             | 28,87        | 32,42        |
| 3                             | 25,06        | 27,70        | 3                             | 26,35        | 29,28        | 3                             | 27,62        | 30,86        | 3                             | 28,89        | 32,45        |
| 4                             | 25,08        | 27,72        | 4                             | 26,37        | 29,31        | 4                             | 27,64        | 30,89        | 4                             | 28,91        | 32,48        |
| 5                             | 25,10        | 27,75        | 5                             | 26,39        | 29,33        | 5                             | 27,66        | 30,92        | 5                             | 28,93        | 32,50        |
| 6                             | 25,12        | 27,78        | 6                             | 26,41        | 29,36        | 6                             | 27,69        | 30,94        | 6                             | 28,95        | 32,53        |
| 7                             | 25,14        | 27,80        | 7                             | 26,43        | 29,39        | 7                             | 27,71        | 30,97        | 7                             | 28,97        | 32,56        |
| 8                             | 25,17        | 27,83        | 8                             | 26,45        | 29,41        | 8                             | 27,73        | 31,00        | 8                             | 28,99        | 32,58        |
| 9                             | 25,19        | 27,86        | 9                             | 26,47        | 29,44        | 9                             | 27,75        | 31,02        | 9                             | 29,01        | 32,61        |
| <b>1,1070</b>                 | <b>25,21</b> | <b>27,88</b> | <b>1,1130</b>                 | <b>26,50</b> | <b>29,47</b> | <b>1,1190</b>                 | <b>27,77</b> | <b>31,05</b> | <b>1,1250</b>                 | <b>29,03</b> | <b>32,64</b> |
| 1                             | 25,23        | 27,91        | 1                             | 26,52        | 29,49        | 1                             | 27,79        | 31,08        | 1                             | 29,06        | 32,66        |
| 2                             | 25,25        | 27,93        | 2                             | 26,54        | 29,52        | 2                             | 27,81        | 31,10        | 2                             | 29,08        | 32,69        |
| 3                             | 25,27        | 27,96        | 3                             | 26,56        | 29,54        | 3                             | 27,83        | 31,13        | 3                             | 29,10        | 32,72        |
| 4                             | 25,29        | 27,99        | 4                             | 26,58        | 29,57        | 4                             | 27,86        | 31,16        | 4                             | 29,12        | 32,74        |
| 5                             | 25,32        | 28,01        | 5                             | 26,60        | 29,60        | 5                             | 27,88        | 31,18        | 5                             | 29,14        | 32,77        |
| 6                             | 25,34        | 28,04        | 6                             | 26,62        | 29,62        | 6                             | 27,90        | 31,21        | 6                             | 29,16        | 32,80        |
| 7                             | 25,36        | 28,07        | 7                             | 26,64        | 29,65        | 7                             | 27,92        | 31,23        | 7                             | 29,18        | 32,82        |
| 8                             | 25,38        | 28,09        | 8                             | 26,67        | 29,68        | 8                             | 27,94        | 31,26        | 8                             | 29,20        | 32,85        |
| 9                             | 25,40        | 28,12        | 9                             | 26,69        | 29,70        | 9                             | 27,96        | 31,29        | 9                             | 29,22        | 32,87        |
| <b>1,1080</b>                 | <b>25,42</b> | <b>28,15</b> | <b>1,1140</b>                 | <b>26,71</b> | <b>29,73</b> | <b>1,1200</b>                 | <b>27,98</b> | <b>31,31</b> | <b>1,1260</b>                 | <b>29,24</b> | <b>32,90</b> |
| 1                             | 25,44        | 28,17        | 1                             | 26,73        | 29,76        | 1                             | 28,00        | 31,34        | 1                             | 29,26        | 32,93        |
| 2                             | 25,47        | 28,20        | 2                             | 26,75        | 29,78        | 2                             | 28,02        | 31,37        | 2                             | 29,29        | 32,95        |
| 3                             | 25,49        | 28,22        | 3                             | 26,77        | 29,81        | 3                             | 28,04        | 31,39        | 3                             | 29,31        | 32,98        |
| 4                             | 25,51        | 28,25        | 4                             | 26,79        | 29,83        | 4                             | 28,07        | 31,42        | 4                             | 29,33        | 33,01        |
| 5                             | 25,53        | 28,28        | 5                             | 26,81        | 29,86        | 5                             | 28,09        | 31,45        | 5                             | 29,35        | 33,03        |
| 6                             | 25,55        | 28,30        | 6                             | 26,84        | 29,89        | 6                             | 28,11        | 31,47        | 6                             | 29,37        | 33,06        |
| 7                             | 25,57        | 28,33        | 7                             | 26,86        | 29,91        | 7                             | 28,13        | 31,50        | 7                             | 29,39        | 33,08        |
| 8                             | 25,60        | 28,36        | 8                             | 26,88        | 29,94        | 8                             | 28,15        | 31,53        | 8                             | 29,41        | 33,11        |
| 9                             | 25,62        | 28,38        | 9                             | 26,90        | 29,96        | 9                             | 28,17        | 31,55        | 9                             | 29,43        | 33,14        |
| <b>1,1090</b>                 | <b>25,64</b> | <b>28,41</b> | <b>1,1150</b>                 | <b>26,92</b> | <b>29,99</b> | <b>1,1210</b>                 | <b>28,19</b> | <b>31,58</b> | <b>1,1270</b>                 | <b>29,45</b> | <b>33,17</b> |
| 1                             | 25,66        | 28,43        | 1                             | 26,94        | 30,02        | 1                             | 28,21        | 31,60        | 1                             | 29,47        | 33,19        |
| 2                             | 25,68        | 28,46        | 2                             | 26,96        | 30,04        | 2                             | 28,24        | 31,63        | 2                             | 29,50        | 33,22        |
| 3                             | 25,70        | 28,49        | 3                             | 26,99        | 30,07        | 3                             | 28,26        | 31,66        | 3                             | 29,52        | 33,25        |
| 4                             | 25,72        | 28,51        | 4                             | 27,01        | 30,10        | 4                             | 28,28        | 31,68        | 4                             | 29,54        | 33,27        |
| 5                             | 25,75        | 28,54        | 5                             | 27,03        | 30,12        | 5                             | 28,30        | 31,71        | 5                             | 29,56        | 33,30        |
| 6                             | 25,77        | 28,57        | 6                             | 27,05        | 30,15        | 6                             | 28,32        | 31,74        | 6                             | 29,58        | 33,33        |
| 7                             | 25,79        | 28,59        | 7                             | 27,07        | 30,18        | 7                             | 28,34        | 31,76        | 7                             | 29,60        | 33,35        |
| 8                             | 25,81        | 28,62        | 8                             | 27,09        | 30,20        | 8                             | 28,36        | 31,79        | 8                             | 29,62        | 33,38        |
| 9                             | 25,83        | 28,65        | 9                             | 27,11        | 30,23        | 9                             | 28,38        | 31,82        | 9                             | 29,64        | 33,40        |

Tabelle II A. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes nach K. WINDISCH. 1675

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |
| <b>1,1280</b>                 | <b>29,66</b> | <b>33,43</b> | <b>1,1700</b>                 | <b>38,17</b> | <b>44,62</b> | <b>1,2300</b>                 | <b>49,49</b> | <b>60,82</b> | <b>1,2900</b>                 | <b>60,01</b> | <b>77,85</b> |
| 1                             | 29,68        | 33,46        | 10                            | 38,36        | 44,88        | 10                            | 49,67        | 61,10        | 10                            | 60,18        | 77,63        |
| 2                             | 29,70        | 33,48        | 20                            | 38,56        | 45,15        | 20                            | 49,85        | 61,37        | 20                            | 60,35        | 77,90        |
| 3                             | 29,73        | 33,51        | 30                            | 38,76        | 45,42        | 30                            | 50,04        | 61,64        | 30                            | 60,52        | 78,19        |
| 4                             | 29,75        | 33,54        | 40                            | 38,95        | 45,69        | 40                            | 50,22        | 61,92        | 40                            | 60,69        | 78,46        |
| 5                             | 29,77        | 33,56        | 50                            | 39,15        | 45,96        | 50                            | 50,40        | 62,19        | 50                            | 60,85        | 78,73        |
| 6                             | 29,79        | 33,59        | 60                            | 39,34        | 46,22        | 60                            | 50,58        | 62,46        | 60                            | 61,02        | 79,02        |
| 7                             | 29,81        | 33,62        | 70                            | 39,54        | 46,49        | 70                            | 50,76        | 62,73        | 70                            | 61,19        | 79,30        |
| 8                             | 29,83        | 33,64        | 80                            | 39,73        | 46,76        | 80                            | 50,94        | 63,01        | 80                            | 61,36        | 79,57        |
| 9                             | 29,85        | 33,67        | 90                            | 39,92        | 47,03        | 90                            | 51,12        | 63,28        | 90                            | 61,53        | 79,86        |
| <b>1,1290</b>                 | <b>29,87</b> | <b>33,70</b> | <b>1,1800</b>                 | <b>40,12</b> | <b>47,30</b> | <b>1,2400</b>                 | <b>51,30</b> | <b>63,56</b> | <b>1,3000</b>                 | <b>61,69</b> | <b>80,13</b> |
| 1                             | 29,89        | 33,72        | 10                            | 40,31        | 47,57        | 10                            | 51,48        | 63,83        | 10                            | 61,86        | 80,41        |
| 2                             | 29,91        | 33,75        | 20                            | 40,50        | 47,83        | 20                            | 51,66        | 64,11        | 20                            | 62,03        | 80,69        |
| 3                             | 29,93        | 33,78        | 30                            | 40,70        | 48,11        | 30                            | 51,83        | 64,37        | 30                            | 62,20        | 80,97        |
| 4                             | 29,95        | 33,80        | 40                            | 40,89        | 48,37        | 40                            | 52,01        | 64,65        | 40                            | 62,36        | 81,25        |
| 5                             | 29,97        | 33,83        | 50                            | 41,08        | 48,64        | 50                            | 52,19        | 64,92        | 50                            | 62,53        | 81,53        |
| 6                             | 30,00        | 33,85        | 60                            | 41,28        | 48,91        | 60                            | 52,37        | 65,20        | 60                            | 62,70        | 81,81        |
| 7                             | 30,02        | 33,88        | 70                            | 41,47        | 49,18        | 70                            | 52,55        | 65,47        | 70                            | 62,86        | 82,09        |
| 8                             | 30,04        | 33,91        | 80                            | 41,66        | 49,45        | 80                            | 52,73        | 65,75        | 80                            | 63,03        | 82,37        |
| 9                             | 30,06        | 33,94        | 90                            | 41,85        | 49,72        | 90                            | 52,90        | 66,02        | 90                            | 63,19        | 82,65        |
| <b>1,1300</b>                 | <b>30,08</b> | <b>33,96</b> | <b>1,1900</b>                 | <b>42,04</b> | <b>49,99</b> | <b>1,2500</b>                 | <b>53,08</b> | <b>66,29</b> | <b>1,3100</b>                 | <b>63,36</b> | <b>82,93</b> |
| 10                            | 30,29        | 34,23        | 10                            | 42,23        | 50,26        | 10                            | 53,26        | 66,57        | 10                            | 63,52        | 83,21        |
| 20                            | 30,49        | 34,49        | 20                            | 42,42        | 50,53        | 20                            | 53,43        | 66,84        | 20                            | 63,69        | 83,49        |
| 30                            | 30,70        | 34,75        | 30                            | 42,62        | 50,80        | 30                            | 53,61        | 67,12        | 30                            | 63,86        | 83,77        |
| 40                            | 30,91        | 35,02        | 40                            | 42,81        | 51,07        | 40                            | 53,79        | 67,40        | 40                            | 64,02        | 84,05        |
| 50                            | 31,12        | 35,29        | 50                            | 43,00        | 51,34        | 50                            | 53,96        | 67,67        | 50                            | 64,19        | 84,34        |
| 60                            | 31,32        | 35,55        | 60                            | 43,19        | 51,61        | 60                            | 54,14        | 67,94        | 60                            | 64,35        | 84,61        |
| 70                            | 31,53        | 35,82        | 70                            | 43,37        | 51,87        | 70                            | 54,32        | 68,22        | 70                            | 64,52        | 84,90        |
| 80                            | 31,73        | 36,08        | 80                            | 43,56        | 52,15        | 80                            | 54,49        | 68,49        | 80                            | 64,68        | 85,18        |
| 90                            | 31,94        | 36,35        | 90                            | 43,75        | 52,42        | 90                            | 54,67        | 68,77        | 90                            | 64,85        | 85,46        |
| <b>1,1400</b>                 | <b>32,14</b> | <b>36,61</b> | <b>1,2000</b>                 | <b>43,94</b> | <b>52,68</b> | <b>1,2600</b>                 | <b>54,84</b> | <b>69,04</b> | <b>1,3200</b>                 | <b>65,01</b> | <b>85,74</b> |
| 10                            | 32,35        | 36,88        | 10                            | 44,13        | 52,95        | 10                            | 55,02        | 69,32        | 10                            | 65,17        | 86,02        |
| 20                            | 32,55        | 37,14        | 20                            | 44,32        | 53,22        | 20                            | 55,19        | 69,59        | 20                            | 65,34        | 86,30        |
| 30                            | 32,76        | 37,41        | 30                            | 44,50        | 53,49        | 30                            | 55,37        | 69,87        | 30                            | 65,50        | 86,58        |
| 40                            | 32,96        | 37,67        | 40                            | 44,69        | 53,76        | 40                            | 55,54        | 70,14        | 40                            | 65,66        | 86,86        |
| 50                            | 33,17        | 37,95        | 50                            | 44,88        | 54,03        | 50                            | 55,72        | 70,42        | 50                            | 65,82        | 87,14        |
| 60                            | 33,37        | 38,21        | 60                            | 45,07        | 54,30        | 60                            | 55,89        | 70,69        | 60                            | 65,99        | 87,43        |
| 70                            | 33,57        | 38,47        | 70                            | 45,25        | 54,58        | 70                            | 56,06        | 70,97        | 70                            | 66,15        | 87,71        |
| 80                            | 33,78        | 38,75        | 80                            | 45,44        | 54,85        | 80                            | 56,24        | 71,25        | 80                            | 66,31        | 87,99        |
| 90                            | 33,98        | 39,01        | 90                            | 45,63        | 55,12        | 90                            | 56,41        | 71,52        | 90                            | 66,48        | 88,27        |
| <b>1,1500</b>                 | <b>34,18</b> | <b>39,27</b> | <b>1,2100</b>                 | <b>45,81</b> | <b>55,39</b> | <b>1,2700</b>                 | <b>56,58</b> | <b>71,80</b> | <b>1,3300</b>                 | <b>66,64</b> | <b>88,55</b> |
| 10                            | 34,38        | 39,54        | 10                            | 46,00        | 55,66        | 10                            | 56,76        | 72,08        | 10                            | 66,80        | 88,84        |
| 20                            | 34,58        | 39,80        | 20                            | 46,19        | 55,93        | 20                            | 56,93        | 72,35        | 20                            | 66,96        | 89,12        |
| 30                            | 34,79        | 40,08        | 30                            | 46,37        | 56,20        | 30                            | 57,10        | 72,63        | 30                            | 67,12        | 89,40        |
| 40                            | 34,99        | 40,34        | 40                            | 46,56        | 56,48        | 40                            | 57,27        | 72,90        | 40                            | 67,29        | 89,69        |
| 50                            | 35,19        | 40,61        | 50                            | 46,74        | 56,75        | 50                            | 57,45        | 73,18        | 50                            | 67,45        | 89,97        |
| 60                            | 35,39        | 40,88        | 60                            | 46,93        | 57,02        | 60                            | 57,62        | 73,46        | 60                            | 67,61        | 90,25        |
| 70                            | 35,59        | 41,14        | 70                            | 47,11        | 57,28        | 70                            | 57,79        | 73,73        | 70                            | 67,77        | 90,53        |
| 80                            | 36,79        | 41,41        | 80                            | 47,30        | 57,56        | 80                            | 57,96        | 74,01        | 80                            | 67,93        | 90,81        |
| 90                            | 35,99        | 41,68        | 90                            | 47,48        | 57,83        | 90                            | 58,13        | 74,29        | 90                            | 68,09        | 91,09        |
| <b>1,1600</b>                 | <b>36,19</b> | <b>41,94</b> | <b>1,2200</b>                 | <b>47,66</b> | <b>58,10</b> | <b>1,2800</b>                 | <b>58,31</b> | <b>74,57</b> | <b>1,3400</b>                 | <b>68,25</b> | <b>91,38</b> |
| 10                            | 36,39        | 42,21        | 10                            | 47,85        | 58,38        | 10                            | 58,48        | 74,85        | 10                            | 68,41        | 91,66        |
| 20                            | 36,59        | 42,48        | 20                            | 48,03        | 58,65        | 20                            | 58,65        | 75,12        | 20                            | 68,57        | 91,94        |
| 30                            | 36,78        | 42,74        | 30                            | 48,22        | 58,92        | 30                            | 58,82        | 75,40        | 30                            | 68,73        | 92,23        |
| 40                            | 36,98        | 43,01        | 40                            | 48,40        | 59,19        | 40                            | 58,99        | 75,68        | 40                            | 68,89        | 92,51        |
| 50                            | 37,18        | 43,28        | 50                            | 48,58        | 59,46        | 50                            | 59,16        | 75,95        | 50                            | 69,05        | 92,79        |
| 60                            | 37,38        | 43,55        | 60                            | 48,76        | 59,73        | 60                            | 59,33        | 76,23        | 60                            | 69,21        | 93,08        |
| 70                            | 37,58        | 43,82        | 70                            | 48,95        | 60,01        | 70                            | 59,50        | 76,51        | 70                            | 69,37        | 93,36        |
| 80                            | 37,77        | 44,08        | 80                            | 49,13        | 60,28        | 80                            | 59,67        | 76,79        | 80                            | 69,53        | 93,65        |
| 90                            | 37,97        | 44,35        | 90                            | 49,31        | 60,55        | 90                            | 59,84        | 77,07        | 90                            | 69,69        | 93,94        |

1676 Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ .

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Zucker       |               |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|---------------|
|                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm |                               | %            | g in 100 ccm  |
| <b>1,3500</b>                 | <b>69,85</b> | <b>94,21</b> | <b>1,3600</b>                 | <b>71,43</b> | <b>97,07</b> | <b>1,3700</b>                 | <b>73,00</b> | <b>99,92</b> | <b>1,3800</b>                 | <b>74,56</b> | <b>102,81</b> |
| 10                            | 70,01        | 94,50        | 10                            | 71,59        | 97,35        | 10                            | 73,16        | 100,21       | 10                            | 74,71        | 103,09        |
| 20                            | 70,16        | 94,79        | 20                            | 71,75        | 97,64        | 20                            | 73,31        | 100,50       | 20                            | 74,87        | 103,38        |
| 30                            | 70,32        | 95,07        | 30                            | 71,90        | 97,92        | 30                            | 73,47        | 100,79       | 30                            | 75,02        | 103,66        |
| 40                            | 70,48        | 95,35        | 40                            | 72,06        | 98,21        | 40                            | 73,62        | 101,07       |                               |              |               |
| 50                            | 70,64        | 95,64        | 50                            | 72,22        | 98,50        | 50                            | 73,78        | 101,36       |                               |              |               |
| 60                            | 70,80        | 95,93        | 60                            | 72,38        | 98,78        | 60                            | 73,94        | 101,65       |                               |              |               |
| 70                            | 70,96        | 96,21        | 70                            | 72,53        | 99,07        | 70                            | 74,09        | 101,93       |                               |              |               |
| 80                            | 71,12        | 96,49        | 80                            | 72,69        | 99,35        | 80                            | 74,25        | 102,23       |                               |              |               |
| 90                            | 71,27        | 96,78        | 90                            | 72,85        | 99,64        | 90                            | 74,40        | 102,51       |                               |              |               |

Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes wäßriger Zuckerlösungen aus der wahren Dichte bei 20° (vgl. S. 837).

(Berechnet von J. GROSSFELD.)

| Dichte $d^{20/4}$ | Zucker      |              | Dichte $d^{20/4}$ | Zucker      |              | Dichte $d^{20/4}$ | Zucker      |              | Dichte $d^{20/4}$ | Zucker      |              |
|-------------------|-------------|--------------|-------------------|-------------|--------------|-------------------|-------------|--------------|-------------------|-------------|--------------|
|                   | %           | g in 1 Liter |                   | %           | g in 1 Liter |                   | %           | g in 1 Liter |                   | %           | g in 1 Liter |
| <b>0,9980</b>     | —           | —            | 5                 | 0,84        | 8,4          | <b>1,0050</b>     | <b>1,74</b> | <b>17,5</b>  | 5                 | 2,64        | 26,6         |
| 1                 | —           | —            | 6                 | 0,87        | 8,7          | 1                 | 1,77        | 17,8         | 6                 | 2,66        | 26,8         |
| 2                 | —           | —            | 7                 | 0,90        | 9,0          | 2                 | 1,79        | 18,0         | 7                 | 2,69        | 27,1         |
| 3                 | 0,02        | 0,2          | 8                 | 0,92        | 9,2          | 3                 | 1,82        | 18,3         | 8                 | 2,71        | 27,3         |
| 4                 | 0,04        | 0,4          | 9                 | 0,95        | 9,5          | 4                 | 1,84        | 18,5         | 9                 | 2,74        | 27,6         |
| 5                 | 0,07        | 0,7          |                   |             |              | 5                 | 1,87        | 18,8         |                   |             |              |
| 6                 | 0,10        | 1,0          | <b>1,0020</b>     | <b>0,97</b> | <b>9,7</b>   | 6                 | 1,89        | 19,1         | <b>1,0090</b>     | <b>2,76</b> | <b>27,9</b>  |
| 7                 | 0,12        | 1,2          | 1                 | 1,00        | 10,0         | 7                 | 1,92        | 19,3         | 1                 | 2,79        | 28,1         |
| 8                 | 0,15        | 1,5          | 2                 | 1,02        | 10,2         | 8                 | 1,95        | 19,6         | 2                 | 2,82        | 28,4         |
| 9                 | 0,17        | 1,7          | 3                 | 1,05        | 10,5         | 9                 | 1,97        | 19,8         | 3                 | 2,84        | 28,6         |
|                   |             |              | 4                 | 1,07        | 10,7         |                   |             |              | 4                 | 2,87        | 28,9         |
| <b>0,9990</b>     | <b>0,20</b> | <b>2,0</b>   | 5                 | 1,10        | 11,0         | <b>1,0060</b>     | <b>2,00</b> | <b>20,1</b>  | 5                 | 2,89        | 29,2         |
| 1                 | 0,22        | 2,2          | 6                 | 1,13        | 11,3         | 1                 | 2,02        | 20,3         | 6                 | 2,92        | 29,4         |
| 2                 | 0,25        | 2,5          | 7                 | 1,15        | 11,5         | 2                 | 2,05        | 20,6         | 7                 | 2,94        | 29,7         |
| 3                 | 0,27        | 2,7          | 8                 | 1,18        | 11,8         | 3                 | 2,07        | 20,9         | 8                 | 2,97        | 29,9         |
| 4                 | 0,30        | 3,0          | 9                 | 1,20        | 12,1         | 4                 | 2,10        | 21,1         | 9                 | 2,99        | 30,2         |
| 5                 | 0,33        | 3,3          |                   |             |              | 5                 | 2,12        | 21,4         |                   |             |              |
| 6                 | 0,35        | 3,5          | <b>1,0030</b>     | <b>1,23</b> | <b>12,3</b>  | 6                 | 2,15        | 21,6         | <b>1,0100</b>     | <b>3,02</b> | <b>30,5</b>  |
| 7                 | 0,38        | 3,8          | 1                 | 1,25        | 12,6         | 7                 | 2,17        | 21,9         | 1                 | 3,04        | 30,7         |
| 8                 | 0,40        | 4,0          | 2                 | 1,28        | 12,8         | 8                 | 2,20        | 22,2         | 2                 | 3,07        | 31,0         |
| 9                 | 0,43        | 4,3          | 3                 | 1,31        | 13,1         | 9                 | 2,22        | 22,4         | 3                 | 3,09        | 31,3         |
|                   |             |              | 4                 | 1,33        | 13,4         |                   |             |              | 4                 | 3,12        | 31,5         |
| <b>1,0000</b>     | <b>0,46</b> | <b>4,6</b>   | 5                 | 1,36        | 13,6         | <b>1,0070</b>     | <b>2,25</b> | <b>22,7</b>  | 5                 | 3,14        | 31,8         |
| 1                 | 0,48        | 4,8          | 6                 | 1,38        | 13,9         | 1                 | 2,28        | 22,9         | 6                 | 3,17        | 32,0         |
| 2                 | 0,51        | 5,1          | 7                 | 1,41        | 14,1         | 2                 | 2,31        | 23,2         | 7                 | 3,19        | 32,3         |
| 3                 | 0,53        | 5,3          | 8                 | 1,43        | 14,4         | 3                 | 2,33        | 23,5         | 8                 | 3,22        | 32,6         |
| 4                 | 0,56        | 5,6          | 9                 | 1,46        | 14,7         | 4                 | 2,36        | 23,7         | 9                 | 3,25        | 32,8         |
| 5                 | 0,58        | 5,8          |                   |             |              | 5                 | 2,38        | 24,0         |                   |             |              |
| 6                 | 0,61        | 6,1          | <b>1,0040</b>     | <b>1,49</b> | <b>14,9</b>  | 6                 | 2,41        | 24,2         | <b>1,0110</b>     | <b>3,27</b> | <b>33,1</b>  |
| 7                 | 0,64        | 6,4          | 1                 | 1,51        | 15,2         | 7                 | 2,43        | 24,5         | 1                 | 3,30        | 33,3         |
| 8                 | 0,66        | 6,6          | 2                 | 1,54        | 15,4         | 8                 | 2,46        | 24,8         | 2                 | 3,32        | 33,6         |
| 9                 | 0,69        | 6,9          | 3                 | 1,56        | 15,7         | 9                 | 2,48        | 25,0         | 3                 | 3,35        | 33,9         |
|                   |             |              | 4                 | 1,59        | 15,9         |                   |             |              | 4                 | 3,37        | 34,1         |
| <b>1,0010</b>     | <b>0,71</b> | <b>7,1</b>   | 5                 | 1,61        | 16,2         | <b>1,0080</b>     | <b>2,51</b> | <b>25,3</b>  | 5                 | 3,40        | 34,4         |
| 1                 | 0,74        | 7,4          | 6                 | 1,64        | 16,5         | 1                 | 2,53        | 25,5         | 6                 | 3,41        | 34,6         |
| 2                 | 0,77        | 7,7          | 7                 | 1,66        | 16,7         | 2                 | 2,56        | 25,8         | 7                 | 3,45        | 34,9         |
| 3                 | 0,79        | 7,9          | 8                 | 1,69        | 17,0         | 3                 | 2,57        | 26,0         | 8                 | 3,47        | 35,1         |
| 4                 | 0,82        | 8,2          | 9                 | 1,71        | 17,2         | 4                 | 2,61        | 26,3         | 9                 | 3,50        | 35,3         |

Tabelle II.B. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ . 1677

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker      |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker      |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker      |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker      |                 |
|----------------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------|-----------------|
|                      | %           | g in<br>1 Liter |                      | %           | g in<br>1 Liter |                      | %           | g in<br>1 Liter |                      | %           | g in<br>1 Liter |
| <b>1,0120</b>        | <b>3,52</b> | <b>35,7</b>     | <b>1,0180</b>        | <b>5,04</b> | <b>51,3</b>     | <b>1,0240</b>        | <b>6,53</b> | <b>66,9</b>     | <b>1,0300</b>        | <b>8,01</b> | <b>82,5</b>     |
| 1                    | 3,55        | 35,9            | 1                    | 5,06        | 51,5            | 1                    | 6,56        | 67,2            | 1                    | 8,04        | 82,8            |
| 2                    | 3,58        | 36,2            | 2                    | 5,09        | 51,8            | 2                    | 6,58        | 67,5            | 2                    | 8,06        | 83,1            |
| 3                    | 3,60        | 36,5            | 3                    | 5,11        | 52,1            | 3                    | 6,61        | 67,7            | 3                    | 8,09        | 83,3            |
| 4                    | 3,63        | 36,7            | 4                    | 5,14        | 52,3            | 4                    | 6,63        | 68,0            | 4                    | 8,11        | 83,6            |
| 5                    | 3,65        | 37,0            | 5                    | 5,16        | 52,6            | 5                    | 6,66        | 68,2            | 5                    | 8,14        | 83,9            |
| 6                    | 3,68        | 37,2            | 6                    | 5,19        | 52,8            | 6                    | 6,68        | 68,5            | 6                    | 8,16        | 84,1            |
| 7                    | 3,70        | 37,5            | 7                    | 5,21        | 53,1            | 7                    | 6,71        | 68,8            | 7                    | 8,19        | 84,4            |
| 8                    | 3,73        | 37,8            | 8                    | 5,24        | 53,4            | 8                    | 6,73        | 69,0            | 8                    | 8,21        | 84,6            |
| 9                    | 3,75        | 38,0            | 9                    | 5,26        | 53,6            | 9                    | 6,76        | 69,3            | 9                    | 8,24        | 84,9            |
| <b>1,0130</b>        | <b>3,78</b> | <b>38,3</b>     | <b>1,0190</b>        | <b>5,29</b> | <b>53,9</b>     | <b>1,0250</b>        | <b>6,78</b> | <b>69,5</b>     | <b>1,0310</b>        | <b>8,26</b> | <b>85,2</b>     |
| 1                    | 3,80        | 38,5            | 1                    | 5,31        | 54,1            | 1                    | 6,81        | 69,8            | 1                    | 8,28        | 85,4            |
| 2                    | 3,83        | 38,8            | 2                    | 5,34        | 54,4            | 2                    | 6,83        | 70,1            | 2                    | 8,31        | 85,7            |
| 3                    | 3,85        | 39,1            | 3                    | 5,36        | 54,7            | 3                    | 6,86        | 70,3            | 3                    | 8,33        | 85,9            |
| 4                    | 3,89        | 39,3            | 4                    | 5,39        | 54,9            | 4                    | 6,88        | 70,6            | 4                    | 8,36        | 86,2            |
| 5                    | 3,90        | 39,5            | 5                    | 5,41        | 55,2            | 5                    | 6,91        | 70,8            | 5                    | 8,38        | 86,5            |
| 6                    | 3,93        | 39,8            | 6                    | 5,44        | 55,4            | 6                    | 6,93        | 71,1            | 6                    | 8,41        | 86,7            |
| 7                    | 3,95        | 40,1            | 7                    | 5,46        | 55,7            | 7                    | 6,95        | 71,4            | 7                    | 8,43        | 87,0            |
| 8                    | 3,98        | 40,4            | 8                    | 5,49        | 56,0            | 8                    | 6,98        | 71,6            | 8                    | 8,46        | 87,3            |
| 9                    | 4,01        | 40,6            | 9                    | 5,51        | 56,2            | 9                    | 7,00        | 71,9            | 9                    | 8,48        | 87,5            |
| <b>1,0140</b>        | <b>4,03</b> | <b>40,9</b>     | <b>1,0200</b>        | <b>5,54</b> | <b>56,5</b>     | <b>1,0260</b>        | <b>7,03</b> | <b>72,1</b>     | <b>1,0320</b>        | <b>8,50</b> | <b>87,8</b>     |
| 1                    | 4,06        | 41,1            | 1                    | 5,56        | 56,7            | 1                    | 7,05        | 72,4            | 1                    | 8,53        | 88,0            |
| 2                    | 4,08        | 41,4            | 2                    | 5,59        | 57,0            | 2                    | 7,08        | 72,7            | 2                    | 8,55        | 88,3            |
| 3                    | 4,11        | 41,7            | 3                    | 5,61        | 57,3            | 3                    | 7,10        | 72,9            | 3                    | 8,58        | 88,6            |
| 4                    | 4,13        | 41,9            | 4                    | 5,64        | 57,5            | 4                    | 7,13        | 73,2            | 4                    | 8,60        | 88,8            |
| 5                    | 4,16        | 42,2            | 5                    | 5,66        | 57,8            | 5                    | 7,15        | 73,4            | 5                    | 8,63        | 89,1            |
| 6                    | 4,18        | 42,4            | 6                    | 5,69        | 58,0            | 6                    | 7,18        | 73,7            | 6                    | 8,65        | 89,3            |
| 7                    | 4,21        | 42,7            | 7                    | 5,71        | 58,3            | 7                    | 7,20        | 74,0            | 7                    | 8,68        | 89,6            |
| 8                    | 4,23        | 43,0            | 8                    | 5,74        | 58,6            | 8                    | 7,23        | 74,2            | 8                    | 8,70        | 89,9            |
| 9                    | 4,26        | 43,2            | 9                    | 5,76        | 58,8            | 9                    | 7,25        | 74,5            | 9                    | 8,73        | 90,1            |
| <b>1,0150</b>        | <b>4,28</b> | <b>43,5</b>     | <b>1,0210</b>        | <b>5,78</b> | <b>59,1</b>     | <b>1,0270</b>        | <b>7,27</b> | <b>74,8</b>     | <b>1,0330</b>        | <b>8,75</b> | <b>90,4</b>     |
| 1                    | 4,31        | 43,7            | 1                    | 5,81        | 59,4            | 1                    | 7,30        | 75,0            | 1                    | 8,77        | 90,6            |
| 2                    | 4,33        | 44,0            | 2                    | 5,84        | 59,6            | 2                    | 7,33        | 75,3            | 2                    | 8,80        | 90,9            |
| 3                    | 4,36        | 44,3            | 3                    | 5,86        | 59,9            | 3                    | 7,35        | 75,5            | 3                    | 8,82        | 91,2            |
| 4                    | 4,38        | 44,5            | 4                    | 5,89        | 60,1            | 4                    | 7,38        | 75,8            | 4                    | 8,85        | 91,4            |
| 5                    | 4,41        | 44,8            | 5                    | 5,91        | 60,4            | 5                    | 7,40        | 76,0            | 5                    | 8,87        | 91,7            |
| 6                    | 4,44        | 45,0            | 6                    | 5,94        | 60,7            | 6                    | 7,42        | 76,3            | 6                    | 8,90        | 91,9            |
| 7                    | 4,46        | 45,3            | 7                    | 5,96        | 61,0            | 7                    | 7,45        | 76,6            | 7                    | 8,92        | 92,2            |
| 8                    | 4,49        | 45,6            | 8                    | 5,99        | 61,2            | 8                    | 7,47        | 76,8            | 8                    | 8,95        | 92,5            |
| 9                    | 4,51        | 45,8            | 9                    | 6,01        | 61,4            | 9                    | 7,50        | 77,1            | 9                    | 8,97        | 92,7            |
| <b>1,0160</b>        | <b>4,54</b> | <b>46,1</b>     | <b>1,0220</b>        | <b>6,04</b> | <b>61,7</b>     | <b>1,0280</b>        | <b>7,52</b> | <b>77,4</b>     | <b>1,0340</b>        | <b>8,99</b> | <b>93,0</b>     |
| 1                    | 4,56        | 46,3            | 1                    | 6,06        | 62,0            | 1                    | 7,55        | 77,6            | 1                    | 9,02        | 93,3            |
| 2                    | 4,59        | 46,6            | 2                    | 6,08        | 62,2            | 2                    | 7,57        | 77,9            | 2                    | 9,04        | 93,5            |
| 3                    | 4,61        | 46,9            | 3                    | 6,11        | 62,5            | 3                    | 7,60        | 78,1            | 3                    | 9,07        | 93,8            |
| 4                    | 4,64        | 47,1            | 4                    | 6,14        | 62,8            | 4                    | 7,62        | 78,4            | 4                    | 9,09        | 94,0            |
| 5                    | 4,67        | 47,4            | 5                    | 6,16        | 63,0            | 5                    | 7,65        | 78,7            | 5                    | 9,12        | 94,3            |
| 6                    | 4,69        | 47,6            | 6                    | 6,19        | 63,3            | 6                    | 7,67        | 78,9            | 6                    | 9,14        | 94,6            |
| 7                    | 4,71        | 47,9            | 7                    | 6,21        | 63,5            | 7                    | 7,70        | 79,2            | 7                    | 9,16        | 94,8            |
| 8                    | 4,74        | 48,2            | 8                    | 6,24        | 63,8            | 8                    | 7,72        | 79,5            | 8                    | 9,19        | 95,1            |
| 9                    | 4,76        | 48,4            | 9                    | 6,26        | 64,1            | 9                    | 7,75        | 79,7            | 9                    | 9,21        | 95,3            |
| <b>1,0170</b>        | <b>4,79</b> | <b>48,7</b>     | <b>1,0230</b>        | <b>6,29</b> | <b>64,3</b>     | <b>1,0290</b>        | <b>7,77</b> | <b>80,0</b>     | <b>1,0350</b>        | <b>9,24</b> | <b>95,6</b>     |
| 1                    | 4,81        | 48,9            | 1                    | 6,31        | 64,6            | 1                    | 7,80        | 80,2            | 1                    | 9,26        | 95,9            |
| 2                    | 4,84        | 49,2            | 2                    | 6,34        | 64,8            | 2                    | 7,82        | 80,5            | 2                    | 9,29        | 96,1            |
| 3                    | 4,86        | 49,5            | 3                    | 6,36        | 65,1            | 3                    | 7,84        | 80,8            | 3                    | 9,31        | 96,4            |
| 4                    | 4,89        | 49,7            | 4                    | 6,39        | 65,4            | 4                    | 7,87        | 81,0            | 4                    | 9,34        | 96,6            |
| 5                    | 4,91        | 50,0            | 5                    | 6,41        | 65,6            | 5                    | 7,89        | 81,3            | 5                    | 9,36        | 96,9            |
| 6                    | 4,94        | 50,2            | 6                    | 6,43        | 65,9            | 6                    | 7,92        | 81,6            | 6                    | 9,38        | 97,2            |
| 7                    | 4,96        | 50,5            | 7                    | 6,46        | 66,1            | 7                    | 7,94        | 81,8            | 7                    | 9,41        | 97,4            |
| 8                    | 4,99        | 50,8            | 8                    | 6,48        | 66,4            | 8                    | 7,97        | 82,0            | 8                    | 9,43        | 97,7            |
| 9                    | 5,01        | 51,0            | 9                    | 6,51        | 66,7            | 9                    | 7,99        | 82,3            | 9                    | 9,46        | 97,9            |

1678 Tabelle II B. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ .

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,0360</b>        | <b>9,48</b>  | <b>98,2</b>     | <b>1,0420</b>        | <b>10,93</b> | <b>113,9</b>    | <b>1,0480</b>        | <b>12,37</b> | <b>129,6</b>    | <b>1,0540</b>        | <b>13,79</b> | <b>145,3</b>    |
| 1                    | 9,51         | 98,5            | 1                    | 10,96        | 114,2           | 1                    | 12,39        | 129,9           | 1                    | 13,81        | 145,6           |
| 2                    | 9,53         | 98,7            | 2                    | 10,98        | 114,4           | 2                    | 12,42        | 130,2           | 2                    | 13,84        | 145,9           |
| 3                    | 9,55         | 99,0            | 3                    | 11,00        | 114,7           | 3                    | 12,44        | 130,4           | 3                    | 13,86        | 146,1           |
| 4                    | 9,58         | 99,3            | 4                    | 11,02        | 115,0           | 4                    | 12,46        | 130,7           | 4                    | 13,88        | 146,4           |
| 5                    | 9,60         | 99,5            | 5                    | 11,05        | 115,2           | 5                    | 12,49        | 130,9           | 5                    | 13,91        | 146,7           |
| 6                    | 9,63         | 99,8            | 6                    | 11,08        | 115,5           | 6                    | 12,51        | 131,2           | 6                    | 13,93        | 146,9           |
| 7                    | 9,65         | 100,0           | 7                    | 11,10        | 115,8           | 7                    | 12,54        | 131,5           | 7                    | 13,95        | 147,2           |
| 8                    | 9,68         | 100,3           | 8                    | 11,12        | 116,0           | 8                    | 12,56        | 131,7           | 8                    | 13,98        | 147,4           |
| 9                    | 9,70         | 100,6           | 9                    | 11,15        | 116,3           | 9                    | 12,58        | 132,0           | 9                    | 14,00        | 147,7           |
| <b>1,0370</b>        | <b>9,72</b>  | <b>100,8</b>    | <b>1,0430</b>        | <b>11,17</b> | <b>116,5</b>    | <b>1,0490</b>        | <b>12,61</b> | <b>132,3</b>    | <b>1,0550</b>        | <b>14,02</b> | <b>148,0</b>    |
| 1                    | 9,75         | 101,1           | 1                    | 11,20        | 116,8           | 1                    | 12,63        | 132,5           | 1                    | 14,05        | 148,2           |
| 2                    | 9,77         | 101,3           | 2                    | 11,22        | 117,1           | 2                    | 12,65        | 132,8           | 2                    | 14,07        | 148,5           |
| 3                    | 9,80         | 101,6           | 3                    | 11,24        | 117,3           | 3                    | 12,68        | 133,0           | 3                    | 14,09        | 148,8           |
| 4                    | 9,82         | 101,9           | 4                    | 11,27        | 117,6           | 4                    | 12,70        | 133,3           | 4                    | 14,12        | 149,0           |
| 5                    | 9,85         | 102,1           | 5                    | 11,29        | 117,8           | 5                    | 12,73        | 133,6           | 5                    | 14,14        | 149,3           |
| 6                    | 9,87         | 102,4           | 6                    | 11,32        | 118,1           | 6                    | 12,75        | 133,8           | 6                    | 14,17        | 149,5           |
| 7                    | 9,89         | 102,6           | 7                    | 11,34        | 118,4           | 7                    | 12,77        | 134,1           | 7                    | 14,19        | 149,8           |
| 8                    | 9,92         | 102,9           | 8                    | 11,36        | 118,6           | 8                    | 12,80        | 134,3           | 8                    | 14,21        | 150,1           |
| 9                    | 9,94         | 103,2           | 9                    | 11,39        | 118,9           | 9                    | 12,82        | 134,6           | 9                    | 14,24        | 150,3           |
| <b>1,0380</b>        | <b>9,97</b>  | <b>103,4</b>    | <b>1,0440</b>        | <b>11,41</b> | <b>119,2</b>    | <b>1,0500</b>        | <b>12,84</b> | <b>134,8</b>    | <b>1,0560</b>        | <b>14,26</b> | <b>150,6</b>    |
| 1                    | 9,99         | 103,7           | 1                    | 11,43        | 119,4           | 1                    | 12,87        | 135,1           | 1                    | 14,28        | 150,8           |
| 2                    | 10,02        | 104,0           | 2                    | 11,46        | 119,7           | 2                    | 12,88        | 135,4           | 2                    | 14,31        | 151,1           |
| 3                    | 10,04        | 104,2           | 3                    | 11,48        | 119,9           | 3                    | 12,91        | 135,6           | 3                    | 14,33        | 151,4           |
| 4                    | 10,06        | 104,5           | 4                    | 11,51        | 120,2           | 4                    | 12,94        | 135,9           | 4                    | 14,35        | 151,6           |
| 5                    | 10,09        | 104,7           | 5                    | 11,53        | 120,5           | 5                    | 12,96        | 136,2           | 5                    | 14,38        | 151,9           |
| 6                    | 10,11        | 105,0           | 6                    | 11,55        | 120,7           | 6                    | 12,98        | 136,4           | 6                    | 14,40        | 152,2           |
| 7                    | 10,14        | 105,3           | 7                    | 11,58        | 121,0           | 7                    | 13,00        | 136,7           | 7                    | 14,42        | 152,4           |
| 8                    | 10,16        | 105,5           | 8                    | 11,60        | 121,2           | 8                    | 13,03        | 136,9           | 8                    | 14,45        | 152,7           |
| 9                    | 10,19        | 105,8           | 9                    | 11,63        | 121,5           | 9                    | 13,05        | 137,2           | 9                    | 14,47        | 152,9           |
| <b>1,0390</b>        | <b>10,21</b> | <b>106,0</b>    | <b>1,0450</b>        | <b>11,65</b> | <b>121,8</b>    | <b>1,0510</b>        | <b>13,07</b> | <b>137,5</b>    | <b>1,0570</b>        | <b>14,50</b> | <b>153,2</b>    |
| 1                    | 10,23        | 106,3           | 1                    | 11,68        | 122,0           | 1                    | 13,10        | 137,7           | 1                    | 14,52        | 153,5           |
| 2                    | 10,26        | 106,6           | 2                    | 11,70        | 122,3           | 2                    | 13,13        | 138,0           | 2                    | 14,54        | 153,7           |
| 3                    | 10,28        | 106,8           | 3                    | 11,72        | 122,6           | 3                    | 13,15        | 138,2           | 3                    | 14,57        | 154,0           |
| 4                    | 10,31        | 107,1           | 4                    | 11,73        | 122,9           | 4                    | 13,17        | 138,5           | 4                    | 14,59        | 154,3           |
| 5                    | 10,33        | 107,3           | 5                    | 11,77        | 123,1           | 5                    | 13,20        | 138,8           | 5                    | 14,61        | 154,5           |
| 6                    | 10,35        | 107,6           | 6                    | 11,79        | 123,3           | 6                    | 13,22        | 139,0           | 6                    | 14,64        | 154,8           |
| 7                    | 10,39        | 107,9           | 7                    | 11,82        | 123,6           | 7                    | 13,24        | 139,3           | 7                    | 14,66        | 155,0           |
| 8                    | 10,40        | 108,1           | 8                    | 11,84        | 123,8           | 8                    | 13,27        | 139,5           | 8                    | 14,68        | 155,3           |
| 9                    | 10,43        | 108,4           | 9                    | 11,87        | 124,1           | 9                    | 13,29        | 139,8           | 9                    | 14,71        | 155,6           |
| <b>1,0400</b>        | <b>10,45</b> | <b>108,7</b>    | <b>1,0460</b>        | <b>11,89</b> | <b>124,4</b>    | <b>1,0520</b>        | <b>13,32</b> | <b>140,1</b>    | <b>1,0580</b>        | <b>14,73</b> | <b>155,8</b>    |
| 1                    | 10,47        | 108,9           | 1                    | 11,91        | 124,7           | 1                    | 13,34        | 140,4           | 1                    | 14,75        | 156,1           |
| 2                    | 10,50        | 109,2           | 2                    | 11,94        | 124,9           | 2                    | 13,36        | 140,6           | 2                    | 14,78        | 156,3           |
| 3                    | 10,52        | 109,5           | 3                    | 11,96        | 125,2           | 3                    | 13,39        | 140,9           | 3                    | 14,80        | 156,6           |
| 4                    | 10,54        | 109,7           | 4                    | 11,99        | 125,4           | 4                    | 13,41        | 141,1           | 4                    | 14,82        | 156,9           |
| 5                    | 10,57        | 110,0           | 5                    | 12,01        | 125,7           | 5                    | 13,44        | 141,4           | 5                    | 14,85        | 157,1           |
| 6                    | 10,59        | 110,3           | 6                    | 12,03        | 126,0           | 6                    | 13,46        | 141,7           | 6                    | 14,87        | 157,4           |
| 7                    | 10,62        | 110,5           | 7                    | 12,06        | 126,2           | 7                    | 13,48        | 141,9           | 7                    | 14,89        | 157,6           |
| 8                    | 10,64        | 110,8           | 8                    | 12,08        | 126,5           | 8                    | 13,51        | 142,2           | 8                    | 14,92        | 157,9           |
| 9                    | 10,66        | 111,0           | 9                    | 12,11        | 126,7           | 9                    | 13,53        | 142,5           | 9                    | 14,94        | 158,2           |
| <b>1,0410</b>        | <b>10,69</b> | <b>111,3</b>    | <b>1,0470</b>        | <b>12,13</b> | <b>127,0</b>    | <b>1,0530</b>        | <b>13,55</b> | <b>142,7</b>    | <b>1,0590</b>        | <b>14,96</b> | <b>158,4</b>    |
| 1                    | 10,71        | 111,6           | 1                    | 12,15        | 127,3           | 1                    | 13,58        | 143,0           | 1                    | 14,99        | 158,7           |
| 2                    | 10,74        | 111,8           | 2                    | 12,18        | 127,5           | 2                    | 13,60        | 143,2           | 2                    | 15,01        | 159,0           |
| 3                    | 10,76        | 112,1           | 3                    | 12,20        | 127,8           | 3                    | 13,62        | 143,5           | 3                    | 15,03        | 159,2           |
| 4                    | 10,79        | 112,3           | 4                    | 12,22        | 128,1           | 4                    | 13,65        | 143,8           | 4                    | 15,06        | 159,5           |
| 5                    | 10,81        | 112,6           | 5                    | 12,25        | 128,3           | 5                    | 13,67        | 144,0           | 5                    | 15,08        | 159,8           |
| 6                    | 10,83        | 112,9           | 6                    | 12,27        | 128,6           | 6                    | 13,70        | 144,3           | 6                    | 15,10        | 160,0           |
| 7                    | 10,86        | 113,1           | 7                    | 12,30        | 128,9           | 7                    | 13,72        | 144,5           | 7                    | 15,13        | 160,3           |
| 8                    | 10,88        | 113,4           | 8                    | 12,32        | 129,1           | 8                    | 13,74        | 144,8           | 8                    | 15,15        | 160,6           |
| 9                    | 10,91        | 113,7           | 9                    | 12,34        | 129,4           | 9                    | 13,77        | 145,1           | 9                    | 15,17        | 160,8           |

Tabelle II B. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ . 1679

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,0600</b>        | <b>15,19</b> | <b>161,1</b>    | <b>1,0660</b>        | <b>16,59</b> | <b>176,8</b>    | <b>1,0720</b>        | <b>17,97</b> | <b>192,6</b>    | <b>1,0780</b>        | <b>19,33</b> | <b>208,4</b>    |
| 1                    | 15,22        | 161,3           | 1                    | 16,61        | 177,1           | 1                    | 17,99        | 192,9           | 1                    | 19,36        | 208,7           |
| 2                    | 15,24        | 161,6           | 2                    | 16,63        | 177,4           | 2                    | 18,01        | 193,1           | 2                    | 19,38        | 208,9           |
| 3                    | 15,26        | 161,9           | 3                    | 16,66        | 177,6           | 3                    | 18,03        | 193,4           | 3                    | 19,40        | 209,2           |
| 4                    | 15,29        | 162,1           | 4                    | 16,68        | 177,9           | 4                    | 18,06        | 193,7           | 4                    | 19,42        | 209,4           |
| 5                    | 15,31        | 162,4           | 5                    | 16,70        | 178,1           | 5                    | 18,08        | 193,9           | 5                    | 19,45        | 209,7           |
| 6                    | 15,33        | 162,7           | 6                    | 16,72        | 178,4           | 6                    | 18,10        | 194,2           | 6                    | 19,47        | 210,0           |
| 7                    | 15,36        | 162,9           | 7                    | 16,75        | 178,7           | 7                    | 18,13        | 194,5           | 7                    | 19,49        | 210,2           |
| 8                    | 15,38        | 163,2           | 8                    | 16,77        | 178,9           | 8                    | 18,15        | 194,7           | 8                    | 19,51        | 210,5           |
| 9                    | 15,40        | 163,4           | 9                    | 16,79        | 179,2           | 9                    | 18,17        | 195,0           | 9                    | 19,54        | 210,8           |
| <b>1,0610</b>        | <b>15,43</b> | <b>163,7</b>    | <b>1,0670</b>        | <b>16,82</b> | <b>179,5</b>    | <b>1,0730</b>        | <b>18,20</b> | <b>195,2</b>    | <b>1,0790</b>        | <b>19,56</b> | <b>211,0</b>    |
| 1                    | 15,45        | 164,0           | 1                    | 16,84        | 179,7           | 1                    | 18,22        | 195,5           | 1                    | 19,58        | 211,3           |
| 2                    | 15,47        | 164,2           | 2                    | 16,86        | 180,0           | 2                    | 18,24        | 195,8           | 2                    | 19,60        | 211,5           |
| 3                    | 15,50        | 164,5           | 3                    | 16,89        | 180,2           | 3                    | 18,26        | 196,0           | 3                    | 19,62        | 211,8           |
| 4                    | 15,52        | 164,8           | 4                    | 16,91        | 180,5           | 4                    | 18,29        | 196,3           | 4                    | 19,65        | 212,1           |
| 5                    | 15,54        | 165,0           | 5                    | 16,93        | 180,8           | 5                    | 18,31        | 196,6           | 5                    | 19,67        | 212,3           |
| 6                    | 15,57        | 165,3           | 6                    | 16,96        | 181,0           | 6                    | 18,33        | 196,8           | 6                    | 19,69        | 212,6           |
| 7                    | 15,59        | 165,5           | 7                    | 16,98        | 181,3           | 7                    | 18,36        | 197,1           | 7                    | 19,71        | 212,8           |
| 8                    | 15,61        | 165,8           | 8                    | 17,00        | 181,5           | 8                    | 18,38        | 197,3           | 8                    | 19,74        | 213,1           |
| 9                    | 15,64        | 166,1           | 9                    | 17,02        | 181,8           | 9                    | 18,40        | 197,6           | 9                    | 19,76        | 213,4           |
| <b>1,0620</b>        | <b>15,66</b> | <b>166,3</b>    | <b>1,0680</b>        | <b>17,05</b> | <b>182,1</b>    | <b>1,0740</b>        | <b>18,42</b> | <b>197,9</b>    | <b>1,0800</b>        | <b>19,78</b> | <b>213,7</b>    |
| 1                    | 15,68        | 166,6           | 1                    | 17,07        | 182,4           | 1                    | 18,45        | 198,1           | 1                    | 19,81        | 213,9           |
| 2                    | 15,71        | 166,8           | 2                    | 17,09        | 182,6           | 2                    | 18,47        | 198,4           | 2                    | 19,83        | 214,2           |
| 3                    | 15,73        | 167,1           | 3                    | 17,12        | 182,9           | 3                    | 18,49        | 198,7           | 3                    | 19,85        | 214,5           |
| 4                    | 15,75        | 167,4           | 4                    | 17,14        | 183,1           | 4                    | 18,51        | 198,9           | 4                    | 19,87        | 214,7           |
| 5                    | 15,79        | 167,6           | 5                    | 17,16        | 183,4           | 5                    | 18,54        | 199,2           | 5                    | 19,90        | 215,0           |
| 6                    | 15,81        | 167,9           | 6                    | 17,19        | 183,7           | 6                    | 18,56        | 199,4           | 6                    | 19,92        | 215,2           |
| 7                    | 15,83        | 168,2           | 7                    | 17,21        | 183,9           | 7                    | 18,58        | 199,7           | 7                    | 19,94        | 215,5           |
| 8                    | 15,86        | 168,4           | 8                    | 17,23        | 184,2           | 8                    | 18,60        | 200,0           | 8                    | 19,96        | 215,8           |
| 9                    | 15,88        | 168,7           | 9                    | 17,26        | 184,5           | 9                    | 18,63        | 200,2           | 9                    | 19,99        | 216,0           |
| <b>1,0630</b>        | <b>15,90</b> | <b>169,0</b>    | <b>1,0690</b>        | <b>17,28</b> | <b>184,7</b>    | <b>1,0750</b>        | <b>18,65</b> | <b>200,5</b>    | <b>1,0810</b>        | <b>20,01</b> | <b>216,3</b>    |
| 1                    | 15,91        | 169,2           | 1                    | 17,30        | 185,0           | 1                    | 18,67        | 200,8           | 1                    | 20,03        | 216,6           |
| 2                    | 15,94        | 169,5           | 2                    | 17,32        | 185,2           | 2                    | 18,70        | 201,0           | 2                    | 20,05        | 216,8           |
| 3                    | 15,96        | 169,7           | 3                    | 17,35        | 185,5           | 3                    | 18,72        | 201,3           | 3                    | 20,08        | 217,1           |
| 4                    | 15,99        | 170,0           | 4                    | 17,37        | 185,8           | 4                    | 18,74        | 201,6           | 4                    | 20,10        | 217,4           |
| 5                    | 16,01        | 170,3           | 5                    | 17,39        | 186,0           | 5                    | 18,76        | 201,8           | 5                    | 20,12        | 217,6           |
| 6                    | 16,03        | 170,5           | 6                    | 17,42        | 186,3           | 6                    | 18,79        | 202,1           | 6                    | 20,14        | 217,9           |
| 7                    | 16,05        | 170,8           | 7                    | 17,44        | 186,5           | 7                    | 18,81        | 202,4           | 7                    | 20,17        | 218,1           |
| 8                    | 16,08        | 171,0           | 8                    | 17,46        | 186,8           | 8                    | 18,83        | 202,6           | 8                    | 20,19        | 218,4           |
| 9                    | 16,10        | 171,3           | 9                    | 17,49        | 187,1           | 9                    | 18,86        | 202,9           | 9                    | 20,21        | 218,7           |
| <b>1,0640</b>        | <b>16,12</b> | <b>171,6</b>    | <b>1,0700</b>        | <b>17,51</b> | <b>187,3</b>    | <b>1,0760</b>        | <b>18,88</b> | <b>203,1</b>    | <b>1,0820</b>        | <b>20,23</b> | <b>218,9</b>    |
| 1                    | 16,15        | 171,8           | 1                    | 17,53        | 187,6           | 1                    | 18,90        | 203,4           | 1                    | 20,26        | 219,2           |
| 2                    | 16,17        | 172,1           | 2                    | 17,55        | 187,9           | 2                    | 18,93        | 203,7           | 2                    | 20,28        | 219,5           |
| 3                    | 16,19        | 172,4           | 3                    | 17,58        | 188,1           | 3                    | 18,95        | 203,9           | 3                    | 20,30        | 219,7           |
| 4                    | 16,22        | 172,6           | 4                    | 17,60        | 188,4           | 4                    | 18,97        | 204,2           | 4                    | 20,32        | 220,0           |
| 5                    | 16,24        | 172,9           | 5                    | 17,62        | 188,6           | 5                    | 18,99        | 204,5           | 5                    | 20,35        | 220,3           |
| 6                    | 16,26        | 173,1           | 6                    | 17,65        | 188,9           | 6                    | 19,02        | 204,7           | 6                    | 20,37        | 220,5           |
| 7                    | 16,29        | 173,4           | 7                    | 17,67        | 189,2           | 7                    | 19,04        | 205,0           | 7                    | 20,39        | 220,8           |
| 8                    | 16,31        | 173,7           | 8                    | 17,69        | 189,4           | 8                    | 19,06        | 205,2           | 8                    | 20,41        | 221,1           |
| 9                    | 16,33        | 173,9           | 9                    | 17,72        | 189,7           | 9                    | 19,08        | 205,5           | 9                    | 20,44        | 221,3           |
| <b>1,0650</b>        | <b>16,36</b> | <b>174,2</b>    | <b>1,0710</b>        | <b>17,74</b> | <b>190,0</b>    | <b>1,0770</b>        | <b>19,11</b> | <b>205,8</b>    | <b>1,0830</b>        | <b>20,46</b> | <b>221,6</b>    |
| 1                    | 16,39        | 174,5           | 1                    | 17,76        | 190,2           | 1                    | 19,13        | 206,0           | 1                    | 20,48        | 221,8           |
| 2                    | 16,40        | 174,7           | 2                    | 17,78        | 190,5           | 2                    | 19,15        | 206,3           | 2                    | 20,50        | 222,1           |
| 3                    | 16,42        | 175,0           | 3                    | 17,81        | 190,8           | 3                    | 19,17        | 206,6           | 3                    | 20,53        | 222,3           |
| 4                    | 16,45        | 175,2           | 4                    | 17,83        | 191,0           | 4                    | 19,20        | 206,8           | 4                    | 20,55        | 222,6           |
| 5                    | 16,47        | 175,5           | 5                    | 17,85        | 191,3           | 5                    | 19,22        | 207,1           | 5                    | 20,57        | 222,9           |
| 6                    | 16,49        | 175,8           | 6                    | 17,87        | 191,6           | 6                    | 19,24        | 207,3           | 6                    | 20,59        | 223,2           |
| 7                    | 16,52        | 176,0           | 7                    | 17,90        | 191,8           | 7                    | 19,26        | 207,6           | 7                    | 20,62        | 223,4           |
| 8                    | 16,54        | 176,3           | 8                    | 17,92        | 192,1           | 8                    | 19,29        | 207,9           | 8                    | 20,64        | 223,7           |
| 9                    | 16,56        | 176,6           | 9                    | 17,94        | 192,3           | 9                    | 19,31        | 208,1           | 9                    | 20,66        | 224,0           |



1680 Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ .

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,0840</b>        | <b>20,68</b> | <b>224,2</b>    | <b>1,0900</b>        | <b>22,02</b> | <b>240,0</b>    | <b>1,0960</b>        | <b>23,35</b> | <b>255,9</b>    | <b>1,1020</b>        | <b>24,66</b> | <b>271,8</b>    |
| 1                    | 20,71        | 224,5           | 1                    | 22,04        | 240,3           | 1                    | 23,37        | 256,2           | 1                    | 24,68        | 272,0           |
| 2                    | 20,73        | 224,7           | 2                    | 22,07        | 240,6           | 2                    | 23,39        | 256,4           | 2                    | 24,70        | 272,3           |
| 3                    | 20,75        | 225,0           | 3                    | 22,09        | 240,8           | 3                    | 23,41        | 256,7           | 3                    | 24,73        | 272,6           |
| 4                    | 20,77        | 225,3           | 4                    | 22,11        | 241,1           | 4                    | 23,44        | 257,0           | 4                    | 24,75        | 272,8           |
| 5                    | 20,80        | 225,5           | 5                    | 22,13        | 241,4           | 5                    | 23,46        | 257,2           | 5                    | 24,77        | 273,1           |
| 6                    | 20,82        | 225,8           | 6                    | 22,16        | 241,6           | 6                    | 23,48        | 257,5           | 6                    | 24,79        | 273,4           |
| 7                    | 20,84        | 226,1           | 7                    | 22,18        | 241,9           | 7                    | 23,50        | 257,8           | 7                    | 24,81        | 273,6           |
| 8                    | 20,86        | 226,3           | 8                    | 22,20        | 242,2           | 8                    | 23,52        | 258,0           | 8                    | 24,84        | 273,9           |
| 9                    | 20,89        | 226,6           | 9                    | 22,23        | 242,4           | 9                    | 23,55        | 258,3           | 9                    | 24,86        | 274,2           |
| <b>1,0850</b>        | <b>20,91</b> | <b>226,9</b>    | <b>1,0910</b>        | <b>22,25</b> | <b>242,7</b>    | <b>1,0970</b>        | <b>23,57</b> | <b>258,5</b>    | <b>1,1030</b>        | <b>24,88</b> | <b>274,4</b>    |
| 1                    | 20,93        | 227,1           | 1                    | 22,27        | 242,9           | 1                    | 23,59        | 258,8           | 1                    | 24,90        | 274,7           |
| 2                    | 20,95        | 227,4           | 2                    | 22,29        | 243,2           | 2                    | 23,61        | 259,1           | 2                    | 24,92        | 274,9           |
| 3                    | 20,97        | 227,7           | 3                    | 22,31        | 243,5           | 3                    | 23,63        | 259,3           | 3                    | 24,94        | 275,2           |
| 4                    | 21,00        | 227,9           | 4                    | 22,33        | 243,7           | 4                    | 23,66        | 259,6           | 4                    | 24,97        | 275,5           |
| 5                    | 21,02        | 228,2           | 5                    | 22,36        | 244,0           | 5                    | 23,68        | 259,9           | 5                    | 24,99        | 275,7           |
| 6                    | 21,04        | 228,4           | 6                    | 22,38        | 244,3           | 6                    | 23,70        | 260,1           | 6                    | 25,01        | 276,0           |
| 7                    | 21,06        | 228,7           | 7                    | 22,40        | 244,5           | 7                    | 23,72        | 260,4           | 7                    | 25,03        | 276,3           |
| 8                    | 21,09        | 229,0           | 8                    | 22,42        | 244,8           | 8                    | 23,74        | 260,7           | 8                    | 25,05        | 276,5           |
| 9                    | 21,11        | 229,2           | 9                    | 22,44        | 245,1           | 9                    | 23,77        | 260,9           | 9                    | 25,08        | 276,8           |
| <b>1,0860</b>        | <b>21,13</b> | <b>229,5</b>    | <b>1,0920</b>        | <b>22,47</b> | <b>245,3</b>    | <b>1,0980</b>        | <b>23,79</b> | <b>261,2</b>    | <b>1,1040</b>        | <b>25,10</b> | <b>277,1</b>    |
| 1                    | 21,15        | 229,8           | 1                    | 22,49        | 245,6           | 1                    | 23,80        | 261,4           | 1                    | 25,12        | 277,3           |
| 2                    | 21,18        | 230,0           | 2                    | 22,51        | 245,9           | 2                    | 23,82        | 261,7           | 2                    | 25,14        | 277,6           |
| 3                    | 21,20        | 230,3           | 3                    | 22,53        | 246,1           | 3                    | 23,84        | 262,0           | 3                    | 25,16        | 277,9           |
| 4                    | 21,22        | 230,6           | 4                    | 22,55        | 246,4           | 4                    | 23,87        | 262,2           | 4                    | 25,18        | 278,1           |
| 5                    | 21,24        | 230,8           | 5                    | 22,58        | 246,6           | 5                    | 23,89        | 262,5           | 5                    | 25,21        | 278,4           |
| 6                    | 21,27        | 231,1           | 6                    | 22,60        | 246,9           | 6                    | 23,91        | 262,8           | 6                    | 25,23        | 278,7           |
| 7                    | 21,29        | 231,3           | 7                    | 22,62        | 247,2           | 7                    | 23,92        | 263,0           | 7                    | 25,25        | 278,9           |
| 8                    | 21,31        | 231,6           | 8                    | 22,64        | 247,4           | 8                    | 23,94        | 263,3           | 8                    | 25,27        | 279,2           |
| 9                    | 21,33        | 231,9           | 9                    | 22,66        | 247,7           | 9                    | 23,97        | 263,6           | 9                    | 25,29        | 279,5           |
| <b>1,0870</b>        | <b>21,36</b> | <b>232,1</b>    | <b>1,0930</b>        | <b>22,69</b> | <b>248,0</b>    | <b>1,0990</b>        | <b>24,00</b> | <b>263,8</b>    | <b>1,1050</b>        | <b>25,31</b> | <b>279,7</b>    |
| 1                    | 21,38        | 232,4           | 1                    | 22,71        | 248,2           | 1                    | 24,03        | 264,1           | 1                    | 25,34        | 280,0           |
| 2                    | 21,40        | 232,7           | 2                    | 22,73        | 248,5           | 2                    | 24,05        | 264,4           | 2                    | 25,36        | 280,2           |
| 3                    | 21,42        | 232,9           | 3                    | 22,75        | 248,8           | 3                    | 24,07        | 264,6           | 3                    | 25,38        | 280,5           |
| 4                    | 21,45        | 233,2           | 4                    | 22,78        | 249,0           | 4                    | 24,09        | 264,9           | 4                    | 25,40        | 280,8           |
| 5                    | 21,47        | 233,5           | 5                    | 22,80        | 249,3           | 5                    | 24,12        | 265,2           | 5                    | 25,42        | 281,0           |
| 6                    | 21,49        | 233,7           | 6                    | 22,82        | 249,6           | 6                    | 24,14        | 265,4           | 6                    | 25,44        | 281,3           |
| 7                    | 21,51        | 234,0           | 7                    | 22,84        | 249,8           | 7                    | 24,16        | 265,7           | 7                    | 25,47        | 281,6           |
| 8                    | 21,53        | 234,2           | 8                    | 22,87        | 250,1           | 8                    | 24,18        | 266,0           | 8                    | 25,49        | 281,8           |
| 9                    | 21,56        | 234,5           | 9                    | 22,89        | 250,4           | 9                    | 24,20        | 266,2           | 9                    | 25,51        | 282,1           |
| <b>1,0880</b>        | <b>21,58</b> | <b>234,8</b>    | <b>1,0940</b>        | <b>22,91</b> | <b>250,6</b>    | <b>1,1000</b>        | <b>24,22</b> | <b>266,5</b>    | <b>1,1060</b>        | <b>25,53</b> | <b>282,4</b>    |
| 1                    | 21,60        | 235,0           | 1                    | 22,93        | 250,9           | 1                    | 24,25        | 266,7           | 1                    | 25,55        | 282,6           |
| 2                    | 21,62        | 235,3           | 2                    | 22,95        | 251,1           | 2                    | 24,28        | 267,0           | 2                    | 25,57        | 282,9           |
| 3                    | 21,65        | 235,6           | 3                    | 22,97        | 251,4           | 3                    | 24,29        | 267,3           | 3                    | 25,60        | 283,2           |
| 4                    | 21,67        | 235,8           | 4                    | 23,00        | 251,7           | 4                    | 24,31        | 267,5           | 4                    | 25,62        | 283,4           |
| 5                    | 21,69        | 236,1           | 5                    | 23,02        | 251,9           | 5                    | 24,33        | 267,8           | 5                    | 25,64        | 283,7           |
| 6                    | 21,71        | 236,4           | 6                    | 23,04        | 252,2           | 6                    | 24,35        | 268,1           | 6                    | 25,66        | 284,0           |
| 7                    | 21,73        | 236,6           | 7                    | 23,06        | 252,5           | 7                    | 24,38        | 268,3           | 7                    | 25,68        | 284,2           |
| 8                    | 21,76        | 236,9           | 8                    | 23,08        | 252,7           | 8                    | 24,40        | 268,6           | 8                    | 25,70        | 284,5           |
| 9                    | 21,78        | 237,1           | 9                    | 23,11        | 253,0           | 9                    | 24,42        | 268,9           | 9                    | 25,73        | 284,8           |
| <b>1,0890</b>        | <b>21,80</b> | <b>237,4</b>    | <b>1,0950</b>        | <b>23,13</b> | <b>253,3</b>    | <b>1,1010</b>        | <b>24,44</b> | <b>269,1</b>    | <b>1,1070</b>        | <b>25,75</b> | <b>285,0</b>    |
| 1                    | 21,82        | 237,7           | 1                    | 23,15        | 253,5           | 1                    | 24,46        | 269,4           | 1                    | 25,77        | 285,3           |
| 2                    | 21,85        | 237,9           | 2                    | 23,17        | 253,8           | 2                    | 24,49        | 269,7           | 2                    | 25,79        | 285,5           |
| 3                    | 21,87        | 238,2           | 3                    | 23,19        | 254,1           | 3                    | 24,51        | 269,9           | 3                    | 25,81        | 285,8           |
| 4                    | 21,89        | 238,5           | 4                    | 23,22        | 254,3           | 4                    | 24,53        | 270,2           | 4                    | 25,84        | 286,1           |
| 5                    | 21,91        | 238,7           | 5                    | 23,24        | 254,6           | 5                    | 24,55        | 270,4           | 5                    | 25,86        | 286,3           |
| 6                    | 21,93        | 239,0           | 6                    | 23,26        | 254,9           | 6                    | 24,57        | 270,7           | 6                    | 25,88        | 286,6           |
| 7                    | 21,96        | 239,3           | 7                    | 23,28        | 255,1           | 7                    | 24,60        | 271,0           | 7                    | 25,90        | 286,9           |
| 8                    | 21,98        | 239,5           | 8                    | 23,30        | 255,4           | 8                    | 24,62        | 271,2           | 8                    | 25,92        | 287,1           |
| 9                    | 22,00        | 239,8           | 9                    | 23,33        | 255,7           | 9                    | 24,64        | 271,5           | 9                    | 25,94        | 287,4           |

Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ . 1681

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,1080</b>        | <b>25,96</b> | <b>287,7</b>    | <b>1,1140</b>        | <b>27,25</b> | <b>303,6</b>    | <b>1,1200</b>        | <b>28,53</b> | <b>319,5</b>    | <b>1,1260</b>        | <b>29,79</b> | <b>335,5</b>    |
| 1                    | 25,99        | 287,9           | 1                    | 27,27        | 303,8           | 1                    | 28,55        | 319,8           | 1                    | 29,82        | 335,7           |
| 2                    | 26,01        | 288,2           | 2                    | 27,29        | 304,1           | 2                    | 28,57        | 320,1           | 2                    | 29,84        | 336,0           |
| 3                    | 26,03        | 288,5           | 3                    | 27,32        | 304,4           | 3                    | 28,59        | 320,3           | 3                    | 29,86        | 336,3           |
| 4                    | 26,05        | 288,7           | 4                    | 27,34        | 304,6           | 4                    | 28,61        | 320,6           | 4                    | 29,88        | 336,5           |
| 5                    | 26,07        | 289,0           | 5                    | 27,36        | 304,9           | 5                    | 28,63        | 320,8           | 5                    | 29,90        | 336,8           |
| 6                    | 26,09        | 289,3           | 6                    | 27,38        | 305,2           | 6                    | 28,66        | 321,1           | 6                    | 29,92        | 337,1           |
| 7                    | 26,12        | 289,5           | 7                    | 27,40        | 305,4           | 7                    | 28,68        | 321,4           | 7                    | 29,94        | 337,3           |
| 8                    | 26,14        | 289,9           | 8                    | 27,42        | 305,7           | 8                    | 28,70        | 321,6           | 8                    | 29,96        | 337,6           |
| 9                    | 26,16        | 290,0           | 9                    | 27,44        | 306,0           | 9                    | 28,72        | 321,9           | 9                    | 29,98        | 337,9           |
| <b>1,1090</b>        | <b>26,18</b> | <b>290,3</b>    | <b>1,1150</b>        | <b>27,47</b> | <b>306,2</b>    | <b>1,1210</b>        | <b>28,74</b> | <b>322,2</b>    | <b>1,1270</b>        | <b>30,00</b> | <b>338,1</b>    |
| 1                    | 26,20        | 290,6           | 1                    | 27,49        | 306,5           | 1                    | 28,76        | 322,4           | 1                    | 30,02        | 338,4           |
| 2                    | 26,22        | 290,8           | 2                    | 27,51        | 306,8           | 2                    | 28,78        | 322,7           | 2                    | 30,05        | 338,7           |
| 3                    | 26,24        | 291,1           | 3                    | 27,53        | 307,0           | 3                    | 28,80        | 323,0           | 3                    | 30,07        | 338,9           |
| 4                    | 26,27        | 291,4           | 4                    | 27,55        | 307,3           | 4                    | 28,82        | 323,2           | 4                    | 30,09        | 339,2           |
| 5                    | 26,29        | 291,6           | 5                    | 27,57        | 307,6           | 5                    | 28,85        | 323,5           | 5                    | 30,11        | 339,5           |
| 6                    | 26,31        | 291,9           | 6                    | 27,59        | 307,8           | 6                    | 28,87        | 323,8           | 6                    | 30,13        | 339,7           |
| 7                    | 26,33        | 292,2           | 7                    | 27,61        | 308,1           | 7                    | 28,89        | 324,0           | 7                    | 30,15        | 340,0           |
| 8                    | 26,35        | 292,4           | 8                    | 27,64        | 308,4           | 8                    | 28,91        | 324,3           | 8                    | 30,17        | 340,3           |
| 9                    | 26,37        | 292,7           | 9                    | 27,66        | 308,6           | 9                    | 28,93        | 324,6           | 9                    | 30,19        | 340,5           |
| <b>1,1100</b>        | <b>26,39</b> | <b>293,0</b>    | <b>1,1160</b>        | <b>27,68</b> | <b>308,9</b>    | <b>1,1220</b>        | <b>28,95</b> | <b>324,8</b>    | <b>1,1280</b>        | <b>30,21</b> | <b>340,8</b>    |
| 1                    | 26,41        | 293,2           | 1                    | 27,70        | 309,2           | 1                    | 28,97        | 325,1           | 1                    | 30,23        | 341,1           |
| 2                    | 26,44        | 293,5           | 2                    | 27,72        | 309,4           | 2                    | 28,99        | 325,4           | 2                    | 30,25        | 341,3           |
| 3                    | 26,46        | 293,8           | 3                    | 27,74        | 309,7           | 3                    | 29,02        | 325,6           | 3                    | 30,27        | 341,6           |
| 4                    | 26,48        | 294,0           | 4                    | 27,77        | 310,0           | 4                    | 29,04        | 325,9           | 4                    | 30,30        | 341,9           |
| 5                    | 26,50        | 294,3           | 5                    | 27,79        | 310,2           | 5                    | 29,06        | 326,2           | 5                    | 30,32        | 342,1           |
| 6                    | 26,52        | 294,5           | 6                    | 27,81        | 310,5           | 6                    | 29,09        | 326,4           | 6                    | 30,34        | 342,4           |
| 7                    | 26,54        | 294,8           | 7                    | 27,83        | 310,7           | 7                    | 29,10        | 326,7           | 7                    | 30,36        | 342,7           |
| 8                    | 26,56        | 295,1           | 8                    | 27,85        | 311,0           | 8                    | 29,12        | 327,0           | 8                    | 30,38        | 342,9           |
| 9                    | 26,59        | 295,3           | 9                    | 27,87        | 311,3           | 9                    | 29,14        | 327,2           | 9                    | 30,40        | 343,2           |
| <b>1,1110</b>        | <b>26,61</b> | <b>295,6</b>    | <b>1,1170</b>        | <b>27,89</b> | <b>311,5</b>    | <b>1,1230</b>        | <b>29,16</b> | <b>327,5</b>    | <b>1,1290</b>        | <b>30,42</b> | <b>343,5</b>    |
| 1                    | 26,63        | 295,9           | 1                    | 27,91        | 311,8           | 1                    | 29,18        | 327,8           | 1                    | 30,44        | 343,7           |
| 2                    | 26,65        | 296,1           | 2                    | 27,94        | 312,1           | 2                    | 29,20        | 328,0           | 2                    | 30,47        | 344,0           |
| 3                    | 26,67        | 296,4           | 3                    | 27,96        | 312,3           | 3                    | 29,23        | 328,3           | 3                    | 30,49        | 344,3           |
| 4                    | 26,69        | 296,7           | 4                    | 27,98        | 312,6           | 4                    | 29,25        | 328,6           | 4                    | 30,51        | 344,5           |
| 5                    | 26,72        | 296,9           | 5                    | 28,00        | 312,9           | 5                    | 29,27        | 328,8           | 5                    | 30,53        | 344,8           |
| 6                    | 26,74        | 297,2           | 6                    | 28,02        | 313,1           | 6                    | 29,29        | 329,1           | 6                    | 30,55        | 345,1           |
| 7                    | 26,76        | 297,5           | 7                    | 28,04        | 313,4           | 7                    | 29,31        | 329,4           | 7                    | 30,57        | 345,3           |
| 8                    | 26,78        | 297,7           | 8                    | 28,06        | 313,7           | 8                    | 29,33        | 329,6           | 8                    | 30,59        | 345,6           |
| 9                    | 26,80        | 298,0           | 9                    | 28,09        | 313,9           | 9                    | 29,35        | 329,9           | 9                    | 30,61        | 345,8           |
| <b>1,1120</b>        | <b>26,82</b> | <b>298,3</b>    | <b>1,1180</b>        | <b>28,11</b> | <b>314,2</b>    | <b>1,1240</b>        | <b>29,37</b> | <b>330,2</b>    | <b>1,1300</b>        | <b>30,63</b> | <b>346,1</b>    |
| 1                    | 26,84        | 298,5           | 1                    | 28,13        | 314,5           | 1                    | 29,39        | 330,4           | 1                    | 30,65        | 346,4           |
| 2                    | 26,87        | 298,8           | 2                    | 28,15        | 314,7           | 2                    | 29,42        | 330,7           | 2                    | 30,67        | 346,7           |
| 3                    | 26,89        | 299,1           | 3                    | 28,17        | 315,0           | 3                    | 29,44        | 331,0           | 3                    | 30,69        | 346,9           |
| 4                    | 26,91        | 299,3           | 4                    | 28,19        | 315,3           | 4                    | 29,46        | 331,2           | 4                    | 30,71        | 347,2           |
| 5                    | 26,93        | 299,6           | 5                    | 28,21        | 315,5           | 5                    | 29,48        | 331,5           | 5                    | 30,73        | 347,5           |
| 6                    | 26,95        | 299,9           | 6                    | 28,23        | 315,8           | 6                    | 29,50        | 331,7           | 6                    | 30,75        | 347,7           |
| 7                    | 26,97        | 300,1           | 7                    | 28,26        | 316,1           | 7                    | 29,52        | 332,0           | 7                    | 30,78        | 348,0           |
| 8                    | 26,99        | 300,4           | 8                    | 28,28        | 316,3           | 8                    | 29,54        | 332,3           | 8                    | 30,80        | 348,3           |
| 9                    | 27,02        | 300,7           | 9                    | 28,30        | 316,6           | 9                    | 29,56        | 332,5           | 9                    | 30,82        | 348,5           |
| <b>1,1130</b>        | <b>27,04</b> | <b>300,9</b>    | <b>1,1190</b>        | <b>28,32</b> | <b>316,9</b>    | <b>1,1250</b>        | <b>29,58</b> | <b>332,8</b>    | <b>1,1310</b>        | <b>30,84</b> | <b>348,8</b>    |
| 1                    | 27,06        | 301,2           | 1                    | 28,34        | 317,1           | 1                    | 29,61        | 333,1           | 1                    | 30,86        | 349,1           |
| 2                    | 27,08        | 301,4           | 2                    | 28,36        | 317,4           | 2                    | 29,63        | 333,4           | 2                    | 30,88        | 349,3           |
| 3                    | 27,10        | 301,7           | 3                    | 28,38        | 317,6           | 3                    | 29,65        | 333,6           | 3                    | 30,90        | 349,6           |
| 4                    | 27,12        | 302,0           | 4                    | 28,40        | 317,9           | 4                    | 29,67        | 333,9           | 4                    | 30,92        | 349,9           |
| 5                    | 27,14        | 302,2           | 5                    | 28,43        | 318,2           | 5                    | 29,69        | 334,1           | 5                    | 30,94        | 350,1           |
| 6                    | 27,16        | 302,5           | 6                    | 28,45        | 318,4           | 6                    | 29,71        | 334,4           | 6                    | 30,96        | 350,4           |
| 7                    | 27,19        | 302,8           | 7                    | 28,47        | 318,7           | 7                    | 29,73        | 334,7           | 7                    | 30,99        | 350,7           |
| 8                    | 27,21        | 303,0           | 8                    | 28,49        | 319,0           | 8                    | 29,75        | 334,9           | 8                    | 31,01        | 350,9           |
| 9                    | 27,23        | 303,3           | 9                    | 28,51        | 319,2           | 9                    | 29,77        | 335,2           | 9                    | 31,03        | 351,2           |

1682 Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20}_4$ .

| Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,1320</b>        | <b>31,05</b> | <b>351,5</b>    | <b>1,1380</b>        | <b>32,29</b> | <b>367,5</b>    | <b>1,1440</b>        | <b>33,52</b> | <b>383,5</b>    | <b>1,1500</b>        | <b>34,74</b> | <b>399,5</b>    |
| 1                    | 31,07        | 351,7           | 1                    | 32,31        | 367,7           | 1                    | 33,54        | 383,8           | 1                    | 34,76        | 399,8           |
| 2                    | 31,09        | 352,0           | 2                    | 32,33        | 368,0           | 2                    | 33,56        | 384,0           | 2                    | 34,78        | 400,1           |
| 3                    | 31,11        | 352,3           | 3                    | 32,35        | 368,3           | 3                    | 33,58        | 384,3           | 3                    | 34,80        | 400,3           |
| 4                    | 31,13        | 352,5           | 4                    | 32,37        | 368,5           | 4                    | 33,60        | 384,6           | 4                    | 34,82        | 400,6           |
| 5                    | 31,15        | 352,8           | 5                    | 32,39        | 368,8           | 5                    | 33,62        | 384,8           | 5                    | 34,84        | 400,9           |
| 6                    | 31,17        | 353,1           | 6                    | 32,42        | 369,1           | 6                    | 33,64        | 385,1           | 6                    | 34,86        | 401,1           |
| 7                    | 31,19        | 353,3           | 7                    | 32,43        | 369,3           | 7                    | 33,66        | 385,4           | 7                    | 34,88        | 401,4           |
| 8                    | 31,21        | 353,6           | 8                    | 32,46        | 369,6           | 8                    | 33,69        | 385,6           | 8                    | 34,90        | 401,7           |
| 9                    | 31,24        | 353,9           | 9                    | 32,48        | 369,9           | 9                    | 33,71        | 385,9           | 9                    | 34,92        | 401,9           |
| <b>1,1330</b>        | <b>31,26</b> | <b>354,1</b>    | <b>1,1390</b>        | <b>32,50</b> | <b>370,1</b>    | <b>1,1450</b>        | <b>33,73</b> | <b>386,2</b>    | <b>1,1510</b>        | <b>34,94</b> | <b>402,2</b>    |
| 1                    | 31,28        | 354,4           | 1                    | 32,52        | 370,4           | 1                    | 33,75        | 386,4           | 1                    | 34,97        | 402,5           |
| 2                    | 31,30        | 354,7           | 2                    | 32,54        | 370,7           | 2                    | 33,77        | 386,7           | 2                    | 34,99        | 402,7           |
| 3                    | 31,32        | 354,9           | 3                    | 32,56        | 370,9           | 3                    | 33,79        | 387,0           | 3                    | 35,01        | 403,0           |
| 4                    | 31,34        | 355,2           | 4                    | 32,58        | 371,2           | 4                    | 33,81        | 387,2           | 4                    | 35,03        | 403,3           |
| 5                    | 31,36        | 355,5           | 5                    | 32,60        | 371,5           | 5                    | 33,83        | 387,5           | 5                    | 35,05        | 403,5           |
| 6                    | 31,38        | 355,7           | 6                    | 32,62        | 371,7           | 6                    | 33,85        | 387,8           | 6                    | 35,07        | 403,8           |
| 7                    | 31,41        | 356,0           | 7                    | 32,64        | 372,0           | 7                    | 33,87        | 388,0           | 7                    | 35,09        | 404,1           |
| 8                    | 31,42        | 356,3           | 8                    | 32,66        | 372,3           | 8                    | 33,89        | 388,3           | 8                    | 35,11        | 404,3           |
| 9                    | 31,44        | 356,5           | 9                    | 32,68        | 372,5           | 9                    | 33,91        | 388,6           | 9                    | 35,13        | 404,6           |
| <b>1,1340</b>        | <b>31,46</b> | <b>356,8</b>    | <b>1,1400</b>        | <b>32,70</b> | <b>372,8</b>    | <b>1,1460</b>        | <b>33,93</b> | <b>388,8</b>    | <b>1,1520</b>        | <b>35,15</b> | <b>404,9</b>    |
| 1                    | 31,48        | 357,1           | 1                    | 32,72        | 373,1           | 1                    | 33,95        | 389,1           | 1                    | 35,17        | 405,2           |
| 2                    | 31,50        | 357,3           | 2                    | 32,74        | 373,3           | 2                    | 33,97        | 389,4           | 2                    | 35,19        | 405,4           |
| 3                    | 31,53        | 357,6           | 3                    | 32,76        | 373,6           | 3                    | 33,99        | 389,6           | 3                    | 35,21        | 405,7           |
| 4                    | 31,55        | 357,9           | 4                    | 32,78        | 373,9           | 4                    | 34,01        | 389,9           | 4                    | 35,23        | 406,0           |
| 5                    | 31,57        | 358,1           | 5                    | 32,80        | 374,1           | 5                    | 34,03        | 390,2           | 5                    | 35,25        | 406,2           |
| 6                    | 31,59        | 358,4           | 6                    | 32,82        | 374,4           | 6                    | 34,05        | 390,4           | 6                    | 35,27        | 406,5           |
| 7                    | 31,61        | 358,7           | 7                    | 32,84        | 374,7           | 7                    | 34,07        | 390,7           | 7                    | 35,29        | 406,8           |
| 8                    | 31,63        | 358,9           | 8                    | 32,87        | 374,9           | 8                    | 34,09        | 391,0           | 8                    | 35,31        | 407,0           |
| 9                    | 31,65        | 359,2           | 9                    | 32,89        | 375,2           | 9                    | 34,11        | 391,2           | 9                    | 35,33        | 407,3           |
| <b>1,1350</b>        | <b>31,67</b> | <b>359,5</b>    | <b>1,1410</b>        | <b>32,91</b> | <b>375,5</b>    | <b>1,1470</b>        | <b>34,13</b> | <b>391,5</b>    | <b>1,1530</b>        | <b>35,35</b> | <b>407,6</b>    |
| 1                    | 31,69        | 359,7           | 1                    | 32,93        | 375,7           | 1                    | 34,15        | 391,8           | 1                    | 35,37        | 407,8           |
| 2                    | 31,71        | 360,0           | 2                    | 32,95        | 376,0           | 2                    | 34,17        | 392,0           | 2                    | 35,39        | 408,1           |
| 3                    | 31,73        | 360,3           | 3                    | 32,97        | 376,3           | 3                    | 34,19        | 392,3           | 3                    | 35,41        | 408,4           |
| 4                    | 31,75        | 360,5           | 4                    | 32,99        | 376,5           | 4                    | 34,21        | 392,6           | 4                    | 35,43        | 408,6           |
| 5                    | 31,77        | 360,8           | 5                    | 33,01        | 376,8           | 5                    | 34,23        | 392,8           | 5                    | 35,45        | 408,9           |
| 6                    | 31,79        | 361,1           | 6                    | 33,03        | 377,1           | 6                    | 34,26        | 393,1           | 6                    | 35,47        | 409,2           |
| 7                    | 31,81        | 361,3           | 7                    | 33,05        | 377,3           | 7                    | 34,28        | 393,4           | 7                    | 35,49        | 409,4           |
| 8                    | 31,84        | 361,6           | 8                    | 33,07        | 377,6           | 8                    | 34,30        | 393,6           | 8                    | 35,51        | 409,7           |
| 9                    | 31,86        | 361,9           | 9                    | 33,09        | 377,9           | 9                    | 34,32        | 393,9           | 9                    | 35,53        | 410,0           |
| <b>1,1360</b>        | <b>31,88</b> | <b>362,1</b>    | <b>1,1420</b>        | <b>33,11</b> | <b>378,1</b>    | <b>1,1480</b>        | <b>34,34</b> | <b>394,2</b>    | <b>1,1540</b>        | <b>35,55</b> | <b>410,3</b>    |
| 1                    | 31,90        | 362,4           | 1                    | 33,13        | 378,4           | 1                    | 34,36        | 394,5           | 1                    | 35,57        | 410,5           |
| 2                    | 31,92        | 362,7           | 2                    | 33,15        | 378,7           | 2                    | 34,38        | 394,7           | 2                    | 35,59        | 410,8           |
| 3                    | 31,94        | 362,9           | 3                    | 33,17        | 378,9           | 3                    | 34,40        | 395,0           | 3                    | 35,61        | 411,1           |
| 4                    | 31,96        | 363,2           | 4                    | 33,19        | 379,2           | 4                    | 34,42        | 395,3           | 4                    | 35,63        | 411,3           |
| 5                    | 31,98        | 363,5           | 5                    | 33,21        | 379,5           | 5                    | 34,44        | 395,5           | 5                    | 35,65        | 411,6           |
| 6                    | 32,00        | 363,7           | 6                    | 33,24        | 379,7           | 6                    | 34,46        | 395,8           | 6                    | 35,67        | 411,9           |
| 7                    | 32,02        | 364,0           | 7                    | 33,26        | 380,0           | 7                    | 34,48        | 396,1           | 7                    | 35,69        | 412,1           |
| 8                    | 32,04        | 364,3           | 8                    | 33,28        | 380,3           | 8                    | 34,50        | 396,3           | 8                    | 35,71        | 412,4           |
| 9                    | 32,06        | 364,5           | 9                    | 33,30        | 380,6           | 9                    | 34,52        | 396,6           | 9                    | 35,73        | 412,7           |
| <b>1,1370</b>        | <b>32,08</b> | <b>364,8</b>    | <b>1,1430</b>        | <b>33,32</b> | <b>380,8</b>    | <b>1,1490</b>        | <b>34,54</b> | <b>396,9</b>    | <b>1,1550</b>        | <b>35,75</b> | <b>412,9</b>    |
| 1                    | 32,10        | 365,1           | 1                    | 33,34        | 381,1           | 1                    | 34,56        | 397,1           | 1                    | 35,77        | 413,2           |
| 2                    | 32,13        | 365,3           | 2                    | 33,36        | 381,3           | 2                    | 34,58        | 397,4           | 2                    | 35,79        | 413,5           |
| 3                    | 32,15        | 365,6           | 3                    | 33,38        | 381,6           | 3                    | 34,60        | 397,7           | 3                    | 35,81        | 413,7           |
| 4                    | 32,17        | 365,9           | 4                    | 33,40        | 381,9           | 4                    | 34,62        | 397,9           | 4                    | 35,83        | 414,0           |
| 5                    | 32,19        | 366,1           | 5                    | 33,42        | 382,1           | 5                    | 34,64        | 398,2           | 5                    | 35,85        | 414,3           |
| 6                    | 32,21        | 366,4           | 6                    | 33,44        | 382,4           | 6                    | 34,66        | 398,5           | 6                    | 35,87        | 414,5           |
| 7                    | 32,23        | 366,7           | 7                    | 33,46        | 382,7           | 7                    | 34,68        | 398,7           | 7                    | 35,89        | 414,8           |
| 8                    | 32,25        | 366,9           | 8                    | 33,48        | 382,9           | 8                    | 34,70        | 399,0           | 8                    | 35,91        | 415,1           |
| 9                    | 32,27        | 367,2           | 9                    | 33,50        | 383,2           | 9                    | 34,72        | 399,3           | 9                    | 35,93        | 415,4           |

Tabelle II.B. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ . 1683

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,1560</b>        | <b>35,95</b> | <b>415,6</b>    | <b>1,1620</b>        | <b>37,15</b> | <b>431,7</b>    | <b>1,1680</b>        | <b>38,34</b> | <b>447,9</b>    | <b>1,1740</b>        | <b>39,52</b> | <b>464,0</b>    |
| 1                    | 35,97        | 415,9           | 1                    | 37,17        | 432,0           | 1                    | 38,36        | 448,1           | 1                    | 39,54        | 464,3           |
| 2                    | 35,99        | 416,2           | 2                    | 37,19        | 432,3           | 2                    | 38,38        | 448,4           | 2                    | 39,56        | 464,5           |
| 3                    | 36,01        | 416,4           | 3                    | 37,21        | 432,5           | 3                    | 38,40        | 448,7           | 3                    | 39,58        | 464,8           |
| 4                    | 36,03        | 416,7           | 4                    | 37,23        | 432,8           | 4                    | 38,42        | 448,9           | 4                    | 39,60        | 465,1           |
| 5                    | 36,05        | 417,0           | 5                    | 37,25        | 433,1           | 5                    | 38,44        | 449,2           | 5                    | 39,62        | 465,3           |
| 6                    | 36,07        | 417,2           | 6                    | 37,27        | 433,3           | 6                    | 38,46        | 449,5           | 6                    | 39,64        | 465,6           |
| 7                    | 36,09        | 417,5           | 7                    | 37,29        | 433,6           | 7                    | 38,48        | 449,7           | 7                    | 39,66        | 465,9           |
| 8                    | 36,11        | 417,8           | 8                    | 37,31        | 433,9           | 8                    | 38,50        | 450,0           | 8                    | 39,68        | 466,2           |
| 9                    | 36,13        | 418,0           | 9                    | 37,33        | 434,1           | 9                    | 38,52        | 450,3           | 9                    | 39,70        | 466,4           |
| <b>1,1570</b>        | <b>36,15</b> | <b>418,3</b>    | <b>1,1630</b>        | <b>37,35</b> | <b>434,4</b>    | <b>1,1690</b>        | <b>38,54</b> | <b>450,5</b>    | <b>1,1750</b>        | <b>39,72</b> | <b>466,7</b>    |
| 1                    | 36,17        | 418,6           | 1                    | 37,37        | 434,7           | 1                    | 38,56        | 450,8           | 1                    | 39,74        | 467,0           |
| 2                    | 36,19        | 418,8           | 2                    | 37,39        | 434,9           | 2                    | 38,58        | 451,1           | 2                    | 39,76        | 467,2           |
| 3                    | 36,21        | 419,1           | 3                    | 37,41        | 435,2           | 3                    | 38,60        | 451,3           | 3                    | 39,78        | 467,5           |
| 4                    | 36,23        | 419,4           | 4                    | 37,43        | 435,5           | 4                    | 38,62        | 451,6           | 4                    | 39,80        | 467,8           |
| 5                    | 36,25        | 419,6           | 5                    | 37,45        | 435,7           | 5                    | 38,64        | 451,9           | 5                    | 39,81        | 468,0           |
| 6                    | 36,27        | 419,9           | 6                    | 37,47        | 436,0           | 6                    | 38,66        | 452,2           | 6                    | 39,83        | 468,3           |
| 7                    | 36,29        | 420,2           | 7                    | 37,49        | 436,3           | 7                    | 38,68        | 452,4           | 7                    | 39,85        | 468,6           |
| 8                    | 36,31        | 420,4           | 8                    | 37,51        | 436,5           | 8                    | 38,70        | 452,7           | 8                    | 39,87        | 468,8           |
| 9                    | 36,33        | 420,7           | 9                    | 37,53        | 436,7           | 9                    | 38,72        | 453,0           | 9                    | 39,89        | 469,1           |
| <b>1,1580</b>        | <b>36,35</b> | <b>421,0</b>    | <b>1,1640</b>        | <b>37,55</b> | <b>437,1</b>    | <b>1,1700</b>        | <b>38,74</b> | <b>453,2</b>    | <b>1,1760</b>        | <b>39,91</b> | <b>469,4</b>    |
| 1                    | 36,37        | 421,3           | 1                    | 37,57        | 437,4           | 1                    | 38,76        | 453,5           | 1                    | 39,93        | 469,6           |
| 2                    | 36,39        | 421,5           | 2                    | 37,59        | 437,6           | 2                    | 38,78        | 453,8           | 2                    | 39,95        | 469,9           |
| 3                    | 36,41        | 421,8           | 3                    | 37,61        | 437,9           | 3                    | 38,80        | 454,0           | 3                    | 39,97        | 470,2           |
| 4                    | 36,43        | 422,1           | 4                    | 37,63        | 438,2           | 4                    | 38,81        | 454,3           | 4                    | 39,99        | 470,5           |
| 5                    | 36,45        | 422,3           | 5                    | 37,65        | 438,4           | 5                    | 38,83        | 454,6           | 5                    | 40,01        | 470,7           |
| 6                    | 36,47        | 422,6           | 6                    | 37,67        | 438,7           | 6                    | 38,85        | 454,8           | 6                    | 40,03        | 471,0           |
| 7                    | 36,49        | 422,9           | 7                    | 37,69        | 439,0           | 7                    | 38,87        | 455,1           | 7                    | 40,05        | 471,3           |
| 8                    | 36,51        | 423,1           | 8                    | 37,71        | 439,3           | 8                    | 38,89        | 455,4           | 8                    | 40,07        | 471,5           |
| 9                    | 36,53        | 423,4           | 9                    | 37,73        | 439,5           | 9                    | 38,91        | 455,6           | 9                    | 40,09        | 471,8           |
| <b>1,1590</b>        | <b>36,55</b> | <b>423,7</b>    | <b>1,1650</b>        | <b>37,75</b> | <b>439,8</b>    | <b>1,1710</b>        | <b>38,93</b> | <b>455,9</b>    | <b>1,1770</b>        | <b>40,11</b> | <b>472,1</b>    |
| 1                    | 36,57        | 423,9           | 1                    | 37,77        | 440,1           | 1                    | 38,95        | 456,2           | 1                    | 40,12        | 472,3           |
| 2                    | 36,59        | 424,2           | 2                    | 37,79        | 440,3           | 2                    | 38,97        | 456,4           | 2                    | 40,15        | 472,6           |
| 3                    | 36,61        | 424,5           | 3                    | 37,81        | 440,6           | 3                    | 38,99        | 456,7           | 3                    | 40,17        | 472,9           |
| 4                    | 36,63        | 424,7           | 4                    | 37,83        | 440,9           | 4                    | 39,01        | 457,0           | 4                    | 40,19        | 473,1           |
| 5                    | 36,65        | 425,0           | 5                    | 37,85        | 441,1           | 5                    | 39,03        | 457,3           | 5                    | 40,21        | 473,4           |
| 6                    | 36,67        | 425,3           | 6                    | 37,87        | 441,4           | 6                    | 39,05        | 457,5           | 6                    | 40,23        | 473,7           |
| 7                    | 36,69        | 425,5           | 7                    | 37,89        | 441,7           | 7                    | 39,07        | 457,8           | 7                    | 40,24        | 474,0           |
| 8                    | 36,71        | 425,8           | 8                    | 37,91        | 441,9           | 8                    | 39,09        | 458,1           | 8                    | 40,26        | 474,2           |
| 9                    | 36,73        | 426,1           | 9                    | 37,93        | 442,2           | 9                    | 39,11        | 458,3           | 9                    | 40,28        | 474,5           |
| <b>1,1600</b>        | <b>36,75</b> | <b>426,4</b>    | <b>1,1660</b>        | <b>37,95</b> | <b>442,5</b>    | <b>1,1720</b>        | <b>39,13</b> | <b>458,6</b>    | <b>1,1780</b>        | <b>40,30</b> | <b>474,8</b>    |
| 1                    | 36,77        | 426,6           | 1                    | 37,97        | 442,7           | 1                    | 39,15        | 458,9           | 1                    | 40,32        | 475,0           |
| 2                    | 36,79        | 426,9           | 2                    | 37,99        | 443,0           | 2                    | 39,17        | 459,1           | 2                    | 40,34        | 475,3           |
| 3                    | 36,81        | 427,2           | 3                    | 38,01        | 443,3           | 3                    | 39,19        | 459,4           | 3                    | 40,36        | 475,6           |
| 4                    | 36,83        | 427,4           | 4                    | 38,03        | 443,5           | 4                    | 39,21        | 459,7           | 4                    | 40,38        | 475,8           |
| 5                    | 36,85        | 427,7           | 5                    | 38,05        | 443,8           | 5                    | 39,23        | 460,0           | 5                    | 40,40        | 476,1           |
| 6                    | 36,87        | 428,0           | 6                    | 38,07        | 444,1           | 6                    | 39,25        | 460,2           | 6                    | 40,42        | 476,4           |
| 7                    | 36,89        | 428,2           | 7                    | 38,08        | 444,4           | 7                    | 39,27        | 460,5           | 7                    | 40,44        | 476,7           |
| 8                    | 36,91        | 428,5           | 8                    | 38,10        | 444,6           | 8                    | 39,29        | 460,8           | 8                    | 40,46        | 476,9           |
| 9                    | 36,93        | 428,8           | 9                    | 38,12        | 444,9           | 9                    | 39,31        | 461,0           | 9                    | 40,48        | 477,2           |
| <b>1,1610</b>        | <b>36,95</b> | <b>429,0</b>    | <b>1,1670</b>        | <b>38,14</b> | <b>445,2</b>    | <b>1,1730</b>        | <b>39,33</b> | <b>461,3</b>    | <b>1,1790</b>        | <b>40,50</b> | <b>477,5</b>    |
| 1                    | 36,97        | 429,3           | 1                    | 38,16        | 445,4           | 1                    | 39,35        | 461,6           | 1                    | 40,52        | 477,7           |
| 2                    | 36,99        | 429,6           | 2                    | 38,18        | 445,7           | 2                    | 39,37        | 461,8           | 2                    | 40,54        | 478,0           |
| 3                    | 37,01        | 429,8           | 3                    | 38,20        | 446,0           | 3                    | 39,39        | 462,1           | 3                    | 40,55        | 478,3           |
| 4                    | 37,03        | 430,1           | 4                    | 38,22        | 446,2           | 4                    | 39,41        | 462,4           | 4                    | 40,57        | 478,5           |
| 5                    | 37,05        | 430,4           | 5                    | 38,24        | 446,5           | 5                    | 39,42        | 462,6           | 5                    | 40,59        | 478,8           |
| 6                    | 37,07        | 430,7           | 6                    | 38,26        | 446,8           | 6                    | 39,44        | 462,9           | 6                    | 40,61        | 479,1           |
| 7                    | 37,09        | 430,9           | 7                    | 38,28        | 447,0           | 7                    | 39,46        | 463,2           | 7                    | 40,63        | 479,3           |
| 8                    | 37,11        | 431,2           | 8                    | 38,30        | 447,3           | 8                    | 39,48        | 463,5           | 8                    | 40,65        | 479,6           |
| 9                    | 37,13        | 431,5           | 9                    | 38,32        | 447,6           | 9                    | 39,50        | 463,8           | 9                    | 40,67        | 479,9           |

1684 Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ .

| Dichte        |              |              | Zucker        |              |              | Dichte        |              |              | Zucker        |              |              | Dichte     |   |              | Zucker     |   |              |
|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|------------|---|--------------|------------|---|--------------|
| $d^{20/4}$    | %            | g in 1 Liter | $d^{20/4}$    | %            | g in 1 Liter | $d^{20/4}$    | %            | g in 1 Liter | $d^{20/4}$    | %            | g in 1 Liter | $d^{20/4}$ | % | g in 1 Liter | $d^{20/4}$ | % | g in 1 Liter |
| <b>1,1800</b> | <b>40,69</b> | <b>480,2</b> | <b>1,1860</b> | <b>41,85</b> | <b>496,4</b> | <b>1,1920</b> | <b>43,00</b> | <b>512,6</b> | <b>1,1980</b> | <b>44,14</b> | <b>528,9</b> |            |   |              |            |   |              |
| 1             | 40,71        | 480,4        | 1             | 41,87        | 496,6        | 1             | 43,02        | 512,9        | 1             | 44,16        | 529,1        |            |   |              |            |   |              |
| 2             | 40,73        | 480,7        | 2             | 41,89        | 496,9        | 2             | 43,04        | 513,1        | 2             | 44,18        | 529,4        |            |   |              |            |   |              |
| 3             | 40,75        | 481,0        | 3             | 41,91        | 497,2        | 3             | 43,06        | 513,4        | 3             | 44,20        | 529,7        |            |   |              |            |   |              |
| 4             | 40,77        | 481,2        | 4             | 41,93        | 497,5        | 4             | 43,08        | 513,7        | 4             | 44,23        | 529,9        |            |   |              |            |   |              |
| 5             | 40,79        | 481,5        | 5             | 41,95        | 497,7        | 5             | 43,10        | 513,9        | 5             | 44,24        | 530,2        |            |   |              |            |   |              |
| 6             | 40,81        | 481,8        | 6             | 41,97        | 498,0        | 6             | 43,12        | 514,2        | 6             | 44,26        | 530,5        |            |   |              |            |   |              |
| 7             | 40,83        | 482,1        | 7             | 41,98        | 498,3        | 7             | 43,13        | 514,5        | 7             | 44,28        | 530,7        |            |   |              |            |   |              |
| 8             | 40,85        | 482,3        | 8             | 42,00        | 498,5        | 8             | 43,15        | 514,8        | 8             | 44,30        | 531,0        |            |   |              |            |   |              |
| 9             | 40,87        | 482,6        | 9             | 42,02        | 498,8        | 9             | 43,17        | 515,0        | 9             | 44,31        | 531,3        |            |   |              |            |   |              |
| <b>1,1810</b> | <b>40,89</b> | <b>482,9</b> | <b>1,1870</b> | <b>42,04</b> | <b>499,1</b> | <b>1,1930</b> | <b>43,19</b> | <b>515,3</b> | <b>1,1990</b> | <b>44,33</b> | <b>531,6</b> |            |   |              |            |   |              |
| 1             | 40,90        | 483,1        | 1             | 42,06        | 499,3        | 1             | 43,21        | 515,6        | 1             | 44,35        | 531,8        |            |   |              |            |   |              |
| 2             | 40,92        | 483,4        | 2             | 42,08        | 499,6        | 2             | 43,23        | 515,8        | 2             | 44,37        | 532,1        |            |   |              |            |   |              |
| 3             | 40,94        | 483,7        | 3             | 42,10        | 499,9        | 3             | 43,25        | 516,1        | 3             | 44,39        | 532,4        |            |   |              |            |   |              |
| 4             | 40,96        | 483,9        | 4             | 42,12        | 500,2        | 4             | 43,27        | 516,4        | 4             | 44,41        | 532,6        |            |   |              |            |   |              |
| 5             | 40,98        | 484,2        | 5             | 42,14        | 500,4        | 5             | 43,29        | 516,7        | 5             | 44,43        | 532,9        |            |   |              |            |   |              |
| 6             | 41,00        | 484,5        | 6             | 42,16        | 500,7        | 6             | 43,31        | 516,9        | 6             | 44,45        | 533,2        |            |   |              |            |   |              |
| 7             | 41,02        | 484,8        | 7             | 42,18        | 501,0        | 7             | 43,33        | 517,2        | 7             | 44,46        | 533,5        |            |   |              |            |   |              |
| 8             | 41,04        | 485,0        | 8             | 42,20        | 501,2        | 8             | 43,34        | 517,5        | 8             | 44,48        | 533,7        |            |   |              |            |   |              |
| 9             | 41,07        | 485,3        | 9             | 42,22        | 501,5        | 9             | 43,36        | 517,7        | 9             | 44,50        | 534,0        |            |   |              |            |   |              |
| <b>1,1820</b> | <b>41,08</b> | <b>485,6</b> | <b>1,1880</b> | <b>42,24</b> | <b>501,8</b> | <b>1,1940</b> | <b>43,38</b> | <b>518,0</b> | <b>1,2000</b> | <b>44,52</b> | <b>534,3</b> |            |   |              |            |   |              |
| 1             | 41,10        | 485,8        | 1             | 42,25        | 502,0        | 1             | 43,40        | 518,3        | 1             | 44,54        | 534,5        |            |   |              |            |   |              |
| 2             | 41,12        | 486,1        | 2             | 42,27        | 502,3        | 2             | 43,42        | 518,6        | 2             | 44,56        | 534,8        |            |   |              |            |   |              |
| 3             | 41,14        | 486,4        | 3             | 42,29        | 502,6        | 3             | 43,44        | 518,8        | 3             | 44,58        | 535,0        |            |   |              |            |   |              |
| 4             | 41,16        | 486,6        | 4             | 42,31        | 502,9        | 4             | 43,46        | 519,1        | 4             | 44,60        | 535,3        |            |   |              |            |   |              |
| 5             | 41,18        | 486,9        | 5             | 42,33        | 503,1        | 5             | 43,48        | 519,4        | 5             | 44,61        | 535,6        |            |   |              |            |   |              |
| 6             | 41,20        | 487,2        | 6             | 42,35        | 503,4        | 6             | 43,50        | 519,6        | 6             | 44,63        | 535,9        |            |   |              |            |   |              |
| 7             | 41,21        | 487,5        | 7             | 42,37        | 503,7        | 7             | 43,52        | 519,9        | 7             | 44,65        | 536,2        |            |   |              |            |   |              |
| 8             | 41,23        | 487,7        | 8             | 42,39        | 503,9        | 8             | 43,53        | 520,2        | 8             | 44,67        | 536,4        |            |   |              |            |   |              |
| 9             | 41,25        | 488,0        | 9             | 42,41        | 504,2        | 9             | 43,55        | 520,5        | 9             | 44,69        | 536,7        |            |   |              |            |   |              |
| <b>1,1830</b> | <b>41,27</b> | <b>488,3</b> | <b>1,1890</b> | <b>42,43</b> | <b>504,5</b> | <b>1,1950</b> | <b>43,57</b> | <b>520,7</b> | <b>1,2010</b> | <b>44,71</b> | <b>537,0</b> |            |   |              |            |   |              |
| 1             | 41,29        | 488,5        | 1             | 42,45        | 504,7        | 1             | 43,59        | 521,0        | 1             | 44,73        | 537,2        |            |   |              |            |   |              |
| 2             | 41,31        | 488,8        | 2             | 42,47        | 505,0        | 2             | 43,61        | 521,3        | 2             | 44,75        | 537,5        |            |   |              |            |   |              |
| 3             | 41,33        | 489,1        | 3             | 42,48        | 505,3        | 3             | 43,63        | 521,5        | 3             | 44,77        | 537,8        |            |   |              |            |   |              |
| 4             | 41,35        | 489,4        | 4             | 42,50        | 505,6        | 4             | 43,65        | 521,8        | 4             | 44,79        | 538,1        |            |   |              |            |   |              |
| 5             | 41,37        | 489,6        | 5             | 42,52        | 505,8        | 5             | 43,67        | 522,1        | 5             | 44,80        | 538,3        |            |   |              |            |   |              |
| 6             | 41,39        | 489,9        | 6             | 42,54        | 506,1        | 6             | 43,69        | 522,3        | 6             | 44,82        | 538,6        |            |   |              |            |   |              |
| 7             | 41,41        | 490,2        | 7             | 42,56        | 506,4        | 7             | 43,71        | 522,6        | 7             | 44,84        | 538,9        |            |   |              |            |   |              |
| 8             | 41,43        | 490,4        | 8             | 42,58        | 506,6        | 8             | 43,73        | 522,9        | 8             | 44,86        | 539,1        |            |   |              |            |   |              |
| 9             | 41,45        | 490,7        | 9             | 42,60        | 506,9        | 9             | 43,74        | 523,2        | 9             | 44,88        | 539,4        |            |   |              |            |   |              |
| <b>1,1840</b> | <b>41,47</b> | <b>491,0</b> | <b>1,1900</b> | <b>42,62</b> | <b>507,2</b> | <b>1,1960</b> | <b>43,76</b> | <b>523,4</b> | <b>1,2020</b> | <b>44,90</b> | <b>539,7</b> |            |   |              |            |   |              |
| 1             | 41,48        | 491,2        | 1             | 42,64        | 507,4        | 1             | 43,78        | 523,7        | 1             | 44,92        | 540,0        |            |   |              |            |   |              |
| 2             | 41,50        | 491,5        | 2             | 42,66        | 507,7        | 2             | 43,80        | 524,0        | 2             | 44,94        | 540,2        |            |   |              |            |   |              |
| 3             | 41,52        | 491,8        | 3             | 42,68        | 508,0        | 3             | 43,82        | 524,2        | 3             | 44,95        | 540,5        |            |   |              |            |   |              |
| 4             | 41,54        | 492,1        | 4             | 42,69        | 508,3        | 4             | 43,84        | 524,5        | 4             | 44,97        | 540,8        |            |   |              |            |   |              |
| 5             | 41,56        | 492,3        | 5             | 42,71        | 508,5        | 5             | 43,86        | 524,8        | 5             | 44,99        | 541,0        |            |   |              |            |   |              |
| 6             | 41,58        | 492,6        | 6             | 42,73        | 508,8        | 6             | 43,88        | 525,1        | 6             | 45,01        | 541,3        |            |   |              |            |   |              |
| 7             | 41,60        | 492,9        | 7             | 42,75        | 509,1        | 7             | 43,90        | 525,3        | 7             | 45,03        | 541,6        |            |   |              |            |   |              |
| 8             | 41,62        | 493,1        | 8             | 42,77        | 509,3        | 8             | 43,92        | 525,6        | 8             | 45,05        | 541,9        |            |   |              |            |   |              |
| 9             | 41,64        | 493,4        | 9             | 42,79        | 509,6        | 9             | 43,93        | 525,9        | 9             | 45,07        | 542,1        |            |   |              |            |   |              |
| <b>1,1850</b> | <b>41,66</b> | <b>493,7</b> | <b>1,1910</b> | <b>42,81</b> | <b>509,9</b> | <b>1,1970</b> | <b>43,95</b> | <b>526,1</b> | <b>1,2030</b> | <b>45,09</b> | <b>542,4</b> |            |   |              |            |   |              |
| 1             | 41,68        | 493,9        | 1             | 42,83        | 510,2        | 1             | 43,97        | 526,4        | 1             | 45,10        | 542,7        |            |   |              |            |   |              |
| 2             | 41,70        | 494,2        | 2             | 42,85        | 510,4        | 2             | 43,99        | 526,7        | 2             | 45,12        | 542,9        |            |   |              |            |   |              |
| 3             | 41,72        | 494,5        | 3             | 42,87        | 510,7        | 3             | 44,01        | 527,0        | 3             | 45,14        | 543,2        |            |   |              |            |   |              |
| 4             | 41,73        | 494,8        | 4             | 42,89        | 511,0        | 4             | 44,03        | 527,2        | 4             | 45,16        | 543,5        |            |   |              |            |   |              |
| 5             | 41,75        | 495,0        | 5             | 42,91        | 511,2        | 5             | 44,05        | 527,5        | 5             | 45,18        | 543,8        |            |   |              |            |   |              |
| 6             | 41,77        | 495,3        | 6             | 42,92        | 511,5        | 6             | 44,07        | 527,8        | 6             | 45,20        | 544,0        |            |   |              |            |   |              |
| 7             | 41,79        | 495,6        | 7             | 42,94        | 511,8        | 7             | 44,09        | 528,0        | 7             | 45,22        | 544,3        |            |   |              |            |   |              |
| 8             | 41,81        | 495,8        | 8             | 42,96        | 512,1        | 8             | 44,11        | 528,3        | 8             | 45,24        | 544,6        |            |   |              |            |   |              |
| 9             | 41,83        | 496,1        | 9             | 42,98        | 512,4        | 9             | 44,13        | 528,6        | 9             | 45,26        | 544,8        |            |   |              |            |   |              |

Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20/4}$ . 1685

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,2040</b>        | <b>45,27</b> | <b>545,1</b>    | <b>1,2100</b>        | <b>46,40</b> | <b>561,4</b>    | <b>1,2160</b>        | <b>47,51</b> | <b>577,8</b>    | <b>1,2220</b>        | <b>48,62</b> | <b>594,1</b>    |
| 1                    | 45,29        | 545,4           | 1                    | 46,42        | 561,7           | 1                    | 47,53        | 578,0           | 1                    | 48,64        | 594,4           |
| 2                    | 45,31        | 545,7           | 2                    | 46,43        | 562,0           | 2                    | 47,55        | 578,3           | 2                    | 48,65        | 594,7           |
| 3                    | 45,33        | 545,9           | 3                    | 46,45        | 562,2           | 3                    | 47,57        | 578,6           | 3                    | 48,67        | 594,9           |
| 4                    | 45,35        | 546,2           | 4                    | 46,47        | 562,5           | 4                    | 47,59        | 578,8           | 4                    | 48,69        | 595,2           |
| 5                    | 45,37        | 546,5           | 5                    | 46,50        | 562,8           | 5                    | 47,60        | 579,1           | 5                    | 48,71        | 595,5           |
| 6                    | 45,39        | 546,7           | 6                    | 46,51        | 563,0           | 6                    | 47,62        | 579,4           | 6                    | 48,73        | 595,7           |
| 7                    | 45,41        | 547,0           | 7                    | 46,53        | 563,3           | 7                    | 47,64        | 579,7           | 7                    | 48,75        | 596,0           |
| 8                    | 45,43        | 547,3           | 8                    | 46,55        | 563,6           | 8                    | 47,66        | 579,9           | 8                    | 48,76        | 596,3           |
| 9                    | 45,44        | 547,6           | 9                    | 46,56        | 563,8           | 9                    | 47,68        | 580,2           | 9                    | 48,78        | 596,6           |
| <b>1,2050</b>        | <b>45,46</b> | <b>547,8</b>    | <b>1,2110</b>        | <b>46,58</b> | <b>564,1</b>    | <b>1,2170</b>        | <b>47,70</b> | <b>580,5</b>    | <b>1,2230</b>        | <b>48,80</b> | <b>596,8</b>    |
| 1                    | 45,48        | 548,1           | 1                    | 46,60        | 564,4           | 1                    | 47,72        | 580,8           | 1                    | 48,82        | 597,1           |
| 2                    | 45,50        | 548,4           | 2                    | 46,62        | 564,7           | 2                    | 47,73        | 581,0           | 2                    | 48,84        | 597,4           |
| 3                    | 45,52        | 548,6           | 3                    | 46,64        | 564,9           | 3                    | 47,75        | 581,3           | 3                    | 48,86        | 597,7           |
| 4                    | 45,54        | 548,9           | 4                    | 46,66        | 565,2           | 4                    | 47,77        | 581,6           | 4                    | 48,87        | 597,9           |
| 5                    | 45,56        | 549,2           | 5                    | 46,68        | 565,5           | 5                    | 47,79        | 581,8           | 5                    | 48,89        | 598,2           |
| 6                    | 45,57        | 549,5           | 6                    | 46,70        | 565,8           | 6                    | 47,81        | 582,1           | 6                    | 48,91        | 598,4           |
| 7                    | 45,59        | 549,7           | 7                    | 46,71        | 566,0           | 7                    | 47,83        | 582,4           | 7                    | 48,93        | 598,7           |
| 8                    | 45,61        | 550,0           | 8                    | 46,73        | 566,3           | 8                    | 47,84        | 582,7           | 8                    | 48,95        | 599,0           |
| 9                    | 45,63        | 550,3           | 9                    | 46,75        | 566,6           | 9                    | 47,86        | 582,9           | 9                    | 48,97        | 599,3           |
| <b>1,2060</b>        | <b>45,65</b> | <b>550,6</b>    | <b>1,2120</b>        | <b>46,77</b> | <b>566,9</b>    | <b>1,2180</b>        | <b>47,88</b> | <b>583,2</b>    | <b>1,2240</b>        | <b>48,98</b> | <b>599,6</b>    |
| 1                    | 45,67        | 550,8           | 1                    | 46,79        | 567,1           | 1                    | 47,90        | 583,5           | 1                    | 49,00        | 599,9           |
| 2                    | 45,69        | 551,1           | 2                    | 46,81        | 567,4           | 2                    | 47,92        | 583,7           | 2                    | 49,02        | 600,1           |
| 3                    | 45,70        | 551,4           | 3                    | 46,83        | 567,7           | 3                    | 47,94        | 584,0           | 3                    | 49,04        | 600,4           |
| 4                    | 45,72        | 551,6           | 4                    | 46,84        | 567,9           | 4                    | 47,96        | 584,3           | 4                    | 49,06        | 600,7           |
| 5                    | 45,74        | 551,9           | 5                    | 46,86        | 568,2           | 5                    | 47,97        | 584,6           | 5                    | 49,08        | 601,0           |
| 6                    | 45,76        | 552,2           | 6                    | 46,88        | 568,5           | 6                    | 47,99        | 584,8           | 6                    | 49,09        | 601,2           |
| 7                    | 45,78        | 552,4           | 7                    | 46,90        | 568,8           | 7                    | 48,01        | 585,1           | 7                    | 49,11        | 601,5           |
| 8                    | 45,80        | 552,7           | 8                    | 46,92        | 569,0           | 8                    | 48,03        | 585,4           | 8                    | 49,13        | 601,8           |
| 9                    | 45,81        | 553,0           | 9                    | 46,94        | 569,3           | 9                    | 48,05        | 585,6           | 9                    | 49,15        | 602,0           |
| <b>1,2070</b>        | <b>45,84</b> | <b>553,3</b>    | <b>1,2130</b>        | <b>46,96</b> | <b>569,6</b>    | <b>1,2190</b>        | <b>48,07</b> | <b>585,9</b>    | <b>1,2250</b>        | <b>49,17</b> | <b>602,3</b>    |
| 1                    | 45,86        | 553,5           | 1                    | 46,97        | 569,9           | 1                    | 48,08        | 586,2           | 1                    | 49,19        | 602,6           |
| 2                    | 45,87        | 553,8           | 2                    | 46,99        | 570,0           | 2                    | 48,10        | 586,5           | 2                    | 49,20        | 602,9           |
| 3                    | 45,89        | 554,1           | 3                    | 47,01        | 570,3           | 3                    | 48,12        | 586,7           | 3                    | 49,22        | 603,1           |
| 4                    | 45,91        | 554,4           | 4                    | 47,03        | 570,7           | 4                    | 48,14        | 587,0           | 4                    | 49,24        | 603,4           |
| 5                    | 45,93        | 554,6           | 5                    | 47,05        | 570,9           | 5                    | 48,16        | 587,3           | 5                    | 49,26        | 603,7           |
| 6                    | 45,95        | 554,9           | 6                    | 47,07        | 571,2           | 6                    | 48,18        | 587,6           | 6                    | 49,28        | 604,0           |
| 7                    | 45,96        | 555,2           | 7                    | 47,09        | 571,5           | 7                    | 48,20        | 587,8           | 7                    | 49,30        | 604,2           |
| 8                    | 45,98        | 555,4           | 8                    | 47,10        | 571,8           | 8                    | 48,21        | 588,1           | 8                    | 49,31        | 604,5           |
| 9                    | 46,00        | 555,7           | 9                    | 47,12        | 572,0           | 9                    | 48,23        | 588,4           | 9                    | 49,33        | 604,8           |
| <b>1,2080</b>        | <b>46,02</b> | <b>556,0</b>    | <b>1,2140</b>        | <b>47,14</b> | <b>572,3</b>    | <b>1,2200</b>        | <b>48,25</b> | <b>588,7</b>    | <b>1,2260</b>        | <b>49,35</b> | <b>605,0</b>    |
| 1                    | 46,04        | 556,3           | 1                    | 47,16        | 572,6           | 1                    | 48,27        | 588,9           | 1                    | 49,37        | 605,3           |
| 2                    | 46,06        | 556,5           | 2                    | 47,18        | 572,8           | 2                    | 48,29        | 589,2           | 2                    | 49,39        | 605,6           |
| 3                    | 46,08        | 556,8           | 3                    | 47,20        | 573,1           | 3                    | 48,30        | 589,5           | 3                    | 49,40        | 605,9           |
| 4                    | 46,10        | 557,1           | 4                    | 47,22        | 573,4           | 4                    | 48,32        | 589,7           | 4                    | 49,42        | 606,1           |
| 5                    | 46,11        | 557,3           | 5                    | 47,23        | 573,7           | 5                    | 48,34        | 590,0           | 5                    | 49,44        | 606,4           |
| 6                    | 46,13        | 557,6           | 6                    | 47,25        | 573,9           | 6                    | 48,36        | 590,3           | 6                    | 49,46        | 606,7           |
| 7                    | 46,15        | 557,9           | 7                    | 47,27        | 574,2           | 7                    | 48,39        | 590,6           | 7                    | 49,48        | 606,9           |
| 8                    | 46,17        | 558,2           | 8                    | 47,29        | 574,5           | 8                    | 48,40        | 590,8           | 8                    | 49,50        | 607,2           |
| 9                    | 46,19        | 558,4           | 9                    | 47,31        | 574,7           | 9                    | 48,42        | 591,1           | 9                    | 49,51        | 607,5           |
| <b>1,2090</b>        | <b>46,21</b> | <b>558,7</b>    | <b>1,2150</b>        | <b>47,33</b> | <b>575,0</b>    | <b>1,2210</b>        | <b>48,43</b> | <b>591,4</b>    | <b>1,2270</b>        | <b>49,53</b> | <b>607,8</b>    |
| 1                    | 46,23        | 559,0           | 1                    | 47,35        | 575,3           | 1                    | 48,45        | 591,7           | 1                    | 49,55        | 608,0           |
| 2                    | 46,25        | 559,2           | 2                    | 47,36        | 575,6           | 2                    | 48,47        | 591,9           | 2                    | 49,57        | 608,3           |
| 3                    | 46,26        | 559,5           | 3                    | 47,38        | 575,8           | 3                    | 48,49        | 592,2           | 3                    | 49,59        | 608,6           |
| 4                    | 46,28        | 559,8           | 4                    | 47,40        | 576,1           | 4                    | 48,51        | 592,5           | 4                    | 49,61        | 608,9           |
| 5                    | 46,30        | 560,1           | 5                    | 47,42        | 576,4           | 5                    | 48,53        | 592,7           | 5                    | 49,62        | 609,1           |
| 6                    | 46,32        | 560,3           | 6                    | 47,44        | 576,7           | 6                    | 48,54        | 593,0           | 6                    | 49,64        | 609,4           |
| 7                    | 46,33        | 560,6           | 7                    | 47,46        | 576,9           | 7                    | 48,56        | 593,3           | 7                    | 49,66        | 609,7           |
| 8                    | 46,35        | 560,9           | 8                    | 47,48        | 577,2           | 8                    | 48,58        | 593,6           | 8                    | 49,68        | 609,9           |
| 9                    | 46,37        | 561,1           | 9                    | 47,49        | 577,5           | 9                    | 48,60        | 593,8           | 9                    | 49,70        | 610,2           |

1686 Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20}_4$ .

| Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Zucker       |                 |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|
|                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |                      | %            | g in<br>1 Liter |
| <b>1,2280</b>        | <b>49,72</b> | <b>610,5</b>    | <b>1,2340</b>        | <b>50,80</b> | <b>626,9</b>    | <b>1,2400</b>        | <b>51,89</b> | <b>643,4</b>    | <b>1,2460</b>        | <b>52,96</b> | <b>659,9</b>    |
| 1                    | 49,73        | 610,8           | 1                    | 50,82        | 627,2           | 1                    | 51,90        | 643,6           | 1                    | 52,98        | 660,1           |
| 2                    | 49,75        | 611,1           | 2                    | 50,84        | 627,5           | 2                    | 51,92        | 643,9           | 2                    | 52,99        | 660,4           |
| 3                    | 49,77        | 611,3           | 3                    | 50,86        | 627,7           | 3                    | 51,94        | 644,2           | 3                    | 53,01        | 660,7           |
| 4                    | 49,79        | 611,6           | 4                    | 50,88        | 628,0           | 4                    | 51,96        | 644,5           | 4                    | 53,03        | 661,0           |
| 5                    | 49,81        | 611,9           | 5                    | 50,89        | 628,3           | 5                    | 51,97        | 644,7           | 5                    | 53,05        | 661,2           |
| 6                    | 49,82        | 612,1           | 6                    | 50,91        | 628,6           | 6                    | 51,99        | 645,0           | 6                    | 53,06        | 661,5           |
| 7                    | 49,84        | 612,4           | 7                    | 50,93        | 628,8           | 7                    | 52,01        | 645,3           | 7                    | 53,08        | 661,8           |
| 8                    | 49,86        | 612,7           | 8                    | 50,95        | 629,1           | 8                    | 52,03        | 645,6           | 8                    | 53,10        | 662,1           |
| 9                    | 49,88        | 613,0           | 9                    | 50,97        | 629,4           | 9                    | 52,05        | 645,8           | 9                    | 53,12        | 662,3           |
| <b>1,2290</b>        | <b>49,90</b> | <b>613,3</b>    | <b>1,2350</b>        | <b>50,99</b> | <b>629,7</b>    | <b>1,2410</b>        | <b>52,06</b> | <b>646,1</b>    | <b>1,2470</b>        | <b>53,14</b> | <b>662,6</b>    |
| 1                    | 49,92        | 613,6           | 1                    | 51,00        | 629,9           | 1                    | 52,08        | 646,4           | 1                    | 53,16        | 662,9           |
| 2                    | 49,93        | 613,8           | 2                    | 51,02        | 630,2           | 2                    | 52,10        | 646,7           | 2                    | 53,17        | 663,2           |
| 3                    | 49,95        | 614,2           | 3                    | 51,04        | 630,5           | 3                    | 52,12        | 646,9           | 3                    | 53,19        | 663,4           |
| 4                    | 49,97        | 614,4           | 4                    | 51,06        | 630,8           | 4                    | 52,14        | 647,2           | 4                    | 53,21        | 663,7           |
| 5                    | 49,99        | 614,6           | 5                    | 51,08        | 631,0           | 5                    | 52,15        | 647,5           | 5                    | 53,23        | 664,0           |
| 6                    | 50,01        | 614,9           | 6                    | 51,09        | 631,3           | 6                    | 52,17        | 647,8           | 6                    | 53,24        | 664,3           |
| 7                    | 50,03        | 615,2           | 7                    | 51,11        | 631,6           | 7                    | 52,19        | 648,0           | 7                    | 53,26        | 664,5           |
| 8                    | 50,04        | 615,4           | 8                    | 51,13        | 631,9           | 8                    | 52,21        | 648,3           | 8                    | 53,28        | 664,8           |
| 9                    | 50,06        | 615,7           | 9                    | 51,15        | 632,1           | 9                    | 52,23        | 648,6           | 9                    | 53,30        | 665,1           |
| <b>1,2300</b>        | <b>50,08</b> | <b>616,0</b>    | <b>1,2360</b>        | <b>51,17</b> | <b>632,4</b>    | <b>1,2420</b>        | <b>52,24</b> | <b>648,9</b>    | <b>1,2480</b>        | <b>53,32</b> | <b>665,4</b>    |
| 1                    | 50,10        | 616,2           | 1                    | 51,18        | 632,7           | 1                    | 52,26        | 649,1           | 1                    | 53,33        | 665,6           |
| 2                    | 50,12        | 616,5           | 2                    | 51,20        | 633,0           | 2                    | 52,28        | 649,4           | 2                    | 53,35        | 665,9           |
| 3                    | 50,13        | 616,8           | 3                    | 51,22        | 633,2           | 3                    | 52,30        | 649,7           | 3                    | 53,37        | 666,2           |
| 4                    | 50,15        | 617,1           | 4                    | 51,24        | 633,5           | 4                    | 52,31        | 650,0           | 4                    | 53,39        | 666,5           |
| 5                    | 50,17        | 617,3           | 5                    | 51,26        | 633,8           | 5                    | 52,32        | 650,2           | 5                    | 53,40        | 666,7           |
| 6                    | 50,19        | 617,6           | 6                    | 51,27        | 634,1           | 6                    | 52,34        | 650,5           | 6                    | 53,42        | 667,0           |
| 7                    | 50,21        | 617,9           | 7                    | 51,29        | 634,3           | 7                    | 52,36        | 650,8           | 7                    | 53,44        | 667,3           |
| 8                    | 50,23        | 618,2           | 8                    | 51,31        | 634,6           | 8                    | 52,38        | 651,1           | 8                    | 53,46        | 667,6           |
| 9                    | 50,24        | 618,4           | 9                    | 51,33        | 634,9           | 9                    | 52,40        | 651,3           | 9                    | 53,47        | 667,8           |
| <b>1,2310</b>        | <b>50,26</b> | <b>618,7</b>    | <b>1,2370</b>        | <b>51,35</b> | <b>635,2</b>    | <b>1,2430</b>        | <b>52,42</b> | <b>651,6</b>    | <b>1,2490</b>        | <b>53,49</b> | <b>668,1</b>    |
| 1                    | 50,28        | 619,0           | 1                    | 51,36        | 635,4           | 1                    | 52,44        | 651,9           | 1                    | 53,51        | 668,4           |
| 2                    | 50,30        | 619,3           | 2                    | 51,38        | 635,7           | 2                    | 52,46        | 652,2           | 2                    | 53,53        | 668,7           |
| 3                    | 50,31        | 619,5           | 3                    | 51,40        | 636,0           | 3                    | 52,48        | 652,4           | 3                    | 53,55        | 668,9           |
| 4                    | 50,33        | 619,8           | 4                    | 51,42        | 636,2           | 4                    | 52,50        | 652,7           | 4                    | 53,56        | 669,2           |
| 5                    | 50,35        | 620,1           | 5                    | 51,44        | 636,5           | 5                    | 52,51        | 653,0           | 5                    | 53,58        | 669,5           |
| 6                    | 50,37        | 620,4           | 6                    | 51,45        | 636,8           | 6                    | 52,53        | 653,3           | 6                    | 53,60        | 669,8           |
| 7                    | 50,39        | 620,6           | 7                    | 51,47        | 637,1           | 7                    | 52,55        | 653,5           | 7                    | 53,62        | 670,0           |
| 8                    | 50,41        | 620,9           | 8                    | 51,49        | 637,3           | 8                    | 52,57        | 653,8           | 8                    | 53,63        | 670,3           |
| 9                    | 50,42        | 621,2           | 9                    | 51,51        | 637,6           | 9                    | 52,58        | 654,1           | 9                    | 53,65        | 670,6           |
| <b>1,2320</b>        | <b>50,44</b> | <b>621,5</b>    | <b>1,2380</b>        | <b>51,53</b> | <b>637,9</b>    | <b>1,2440</b>        | <b>52,60</b> | <b>654,4</b>    | <b>1,2500</b>        | <b>53,67</b> | <b>670,9</b>    |
| 1                    | 50,46        | 621,7           | 1                    | 51,54        | 638,2           | 1                    | 52,62        | 654,6           | 10                   | 53,85        | 673,6           |
| 2                    | 50,48        | 622,0           | 2                    | 51,56        | 638,4           | 2                    | 52,64        | 654,9           | 20                   | 54,02        | 676,4           |
| 3                    | 50,50        | 622,3           | 3                    | 51,58        | 638,7           | 3                    | 52,65        | 655,2           | 30                   | 54,20        | 679,1           |
| 4                    | 50,51        | 622,6           | 4                    | 51,60        | 639,0           | 4                    | 52,67        | 655,5           | 40                   | 54,38        | 681,9           |
| 5                    | 50,53        | 622,8           | 5                    | 51,62        | 639,3           | 5                    | 52,69        | 655,7           | 50                   | 54,55        | 684,7           |
| 6                    | 50,55        | 623,1           | 6                    | 51,63        | 639,5           | 6                    | 52,71        | 656,0           | 60                   | 54,73        | 687,4           |
| 7                    | 50,57        | 623,4           | 7                    | 51,65        | 639,8           | 7                    | 52,73        | 656,3           | 70                   | 54,91        | 690,2           |
| 8                    | 50,59        | 623,6           | 8                    | 51,67        | 640,1           | 8                    | 52,74        | 656,6           | 80                   | 55,08        | 692,9           |
| 9                    | 50,60        | 623,9           | 9                    | 51,69        | 640,4           | 9                    | 52,76        | 656,8           | 90                   | 55,26        | 695,7           |
| <b>1,2330</b>        | <b>50,62</b> | <b>624,2</b>    | <b>1,2390</b>        | <b>51,71</b> | <b>640,6</b>    | <b>1,2450</b>        | <b>52,78</b> | <b>657,1</b>    | <b>1,2600</b>        | <b>55,43</b> | <b>698,5</b>    |
| 1                    | 50,64        | 624,5           | 1                    | 51,72        | 640,9           | 1                    | 52,80        | 657,4           | 10                   | 55,61        | 701,2           |
| 2                    | 50,66        | 624,7           | 2                    | 51,74        | 641,2           | 2                    | 52,82        | 657,7           | 20                   | 55,78        | 704,0           |
| 3                    | 50,68        | 625,9           | 3                    | 51,76        | 641,5           | 3                    | 52,83        | 657,9           | 30                   | 55,96        | 706,8           |
| 4                    | 50,70        | 625,3           | 4                    | 51,78        | 641,7           | 4                    | 52,85        | 658,2           | 40                   | 56,13        | 709,5           |
| 5                    | 50,71        | 625,6           | 5                    | 51,80        | 642,0           | 5                    | 52,87        | 658,5           | 50                   | 56,36        | 712,3           |
| 6                    | 50,73        | 625,8           | 6                    | 51,81        | 642,3           | 6                    | 52,89        | 658,8           | 60                   | 56,48        | 705,1           |
| 7                    | 50,75        | 626,1           | 7                    | 51,83        | 642,5           | 7                    | 52,90        | 659,0           | 70                   | 56,65        | 707,8           |
| 8                    | 50,77        | 626,4           | 8                    | 51,85        | 642,8           | 8                    | 52,92        | 659,3           | 80                   | 56,83        | 720,6           |
| 9                    | 50,79        | 626,7           | 9                    | 51,87        | 643,1           | 9                    | 52,94        | 659,6           | 90                   | 57,00        | 723,3           |

Tabelle IIB. Ermittlung des Zucker- (bzw. Extrakt-) Gehaltes aus  $d^{20}_4$ . 1687

| Zucker          |                    |                    | Zucker        |              |               | Zucker        |              |               | Zucker        |              |               |
|-----------------|--------------------|--------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| Dichte          | %                  | g in 1 Liter       | Dichte        | %            | g in 1 Liter  | Dichte        | %            | g in 1 Liter  | Dichte        | %            | g in 1 Liter  |
| $d^{20}_4$      |                    |                    | $d^{20}_4$    |              |               | $d^{20}_4$    |              |               | $d^{20}_4$    |              |               |
| <b>1,2700</b>   | <b>57,18</b>       | <b>726,1</b>       | <b>1,3300</b> | <b>67,23</b> | <b>894,2</b>  | <b>1,3900</b> | <b>76,70</b> | <b>1066,1</b> | <b>1,4500</b> | <b>85,68</b> | <b>1242,3</b> |
| 10              | 57,35              | 728,9              | 10            | 67,40        | 897,1         | 10            | 76,85        | 1069,0        | 10            | 85,82        | 1245,3        |
| 20              | 57,52              | 731,7              | 20            | 67,56        | 899,9         | 20            | 77,01        | 1071,9        | 20            | 85,97        | 1248,2        |
| 30              | 57,69              | 734,5              | 30            | 67,72        | 902,7         | 30            | 77,16        | 1074,9        | 30            | 86,11        | 1251,2        |
| 40              | 57,87              | 737,2              | 40            | 67,88        | 905,6         | 40            | 77,31        | 1077,8        | 40            | 86,26        | 1254,2        |
| 50              | 58,04              | 740,0              | 50            | 68,04        | 908,4         | 50            | 77,47        | 1080,7        | 50            | 86,40        | 1257,2        |
| 60              | 58,21              | 742,8              | 60            | 68,21        | 911,2         | 60            | 77,62        | 1083,6        | 60            | 86,55        | 1260,2        |
| 70              | 58,38              | 745,6              | 70            | 68,37        | 914,1         | 70            | 77,77        | 1086,5        | 70            | 86,69        | 1263,1        |
| 80              | 58,56              | 748,3              | 80            | 68,53        | 916,9         | 80            | 77,92        | 1089,4        | 80            | 86,84        | 1266,1        |
| 90              | 58,73              | 751,1              | 90            | 68,69        | 919,8         | 90            | 78,08        | 1092,3        | 90            | 86,98        | 1269,1        |
| <b>1,2800</b>   | <b>58,90</b>       | <b>753,9</b>       | <b>1,3400</b> | <b>68,85</b> | <b>922,6</b>  | <b>1,4000</b> | <b>78,23</b> | <b>1095,2</b> | <b>1,4600</b> | <b>87,13</b> | <b>1272,1</b> |
| 10              | 59,07              | 766,7              | 10            | 69,01        | 925,5         | 10            | 78,38        | 1098,1        | 10            | 87,27        | 1275,1        |
| 20              | 59,24              | 769,5              | 20            | 69,17        | 928,3         | 20            | 78,53        | 1101,0        | 20            | 87,42        | 1278,1        |
| 30              | 59,41              | 762,3              | 30            | 69,33        | 931,1         | 30            | 78,68        | 1103,9        | 30            | 87,56        | 1281,1        |
| 40              | 59,58              | 765,0              | 40            | 69,49        | 934,0         | 40            | 78,83        | 1106,9        | 40            | 87,71        | 1284,0        |
| 50              | 59,75              | 767,8              | 50            | 69,65        | 936,8         | 50            | 78,99        | 1109,8        | 50            | 87,85        | 1287,0        |
| 60              | 59,92              | 770,6              | 60            | 69,81        | 939,7         | 60            | 79,14        | 1112,7        | 60            | 88,00        | 1290,0        |
| 70              | 60,09              | 773,4              | 70            | 69,97        | 942,5         | 70            | 79,29        | 1115,6        | 70            | 88,14        | 1293,0        |
| 80              | 60,26              | 776,2              | 80            | 70,13        | 945,4         | 80            | 79,44        | 1118,5        | 80            | 88,28        | 1296,0        |
| 90              | 60,43              | 779,0              | 90            | 70,29        | 948,2         | 90            | 79,59        | 1121,4        | 90            | 88,43        | 1299,0        |
| <b>1,2900</b>   | <b>60,60</b>       | <b>781,8</b>       | <b>1,3500</b> | <b>70,45</b> | <b>951,1</b>  | <b>1,4100</b> | <b>79,74</b> | <b>1124,4</b> | <b>1,4700</b> | <b>88,57</b> | <b>1302,0</b> |
| 10              | 60,77              | 784,6              | 10            | 70,61        | 953,9         | 10            | 79,89        | 1127,3        | 10            | 88,72        | 1305,0        |
| 20              | 60,94              | 787,4              | 20            | 70,77        | 956,8         | 20            | 80,04        | 1130,2        | 20            | 88,86        | 1308,0        |
| 30              | 61,11              | 790,2              | 30            | 70,93        | 959,7         | 30            | 80,19        | 1133,1        | 30            | 89,00        | 1311,0        |
| 40              | 61,28              | 793,0              | 40            | 71,09        | 962,5         | 40            | 80,34        | 1136,1        | 40            | 89,15        | 1314,0        |
| 50              | 61,45              | 795,8              | 50            | 71,24        | 965,4         | 50            | 80,49        | 1139,0        | 50            | 89,29        | 1317,0        |
| 60              | 61,62              | 798,6              | 60            | 71,40        | 968,2         | 60            | 80,64        | 1141,9        | 60            | 89,43        | 1320,0        |
| 70              | 61,78              | 801,4              | 70            | 71,56        | 971,1         | 70            | 80,79        | 1144,9        | 70            | 89,57        | 1323,0        |
| 80              | 61,95              | 804,2              | 80            | 71,72        | 974,0         | 80            | 80,94        | 1147,8        | 80            | 89,72        | 1326,0        |
| 90              | 62,12              | 807,0              | 90            | 71,88        | 976,8         | 90            | 81,09        | 1150,7        | 90            | 89,86        | 1329,0        |
| <b>1,3000</b>   | <b>62,29</b>       | <b>809,7</b>       | <b>1,3600</b> | <b>72,03</b> | <b>979,7</b>  | <b>1,4200</b> | <b>81,24</b> | <b>1153,7</b> | <b>1,4800</b> | <b>90,00</b> | <b>1332,1</b> |
| 10              | 62,45              | 812,5              | 10            | 72,19        | 982,5         | 10            | 81,39        | 1156,6        | 10            | 90,15        | 1335,1        |
| 20              | 62,62              | 815,3              | 20            | 72,35        | 985,4         | 20            | 81,54        | 1159,5        | 20            | 90,29        | 1338,1        |
| 30              | 62,79              | 818,1              | 30            | 72,51        | 988,3         | 30            | 81,69        | 1162,5        | 30            | 90,43        | 1341,1        |
| 40              | 62,96              | 821,0              | 40            | 72,66        | 991,2         | 40            | 81,84        | 1165,4        | 40            | 90,57        | 1344,1        |
| 50              | 63,12              | 823,8              | 50            | 72,82        | 994,0         | 50            | 81,99        | 1168,4        | 50            | 90,72        | 1347,1        |
| 60              | 63,29              | 826,6              | 60            | 72,99        | 996,9         | 60            | 82,14        | 1171,3        | 60            | 90,86        | 1350,1        |
| 70              | 63,46              | 829,4              | 70            | 73,13        | 997,8         | 70            | 82,29        | 1174,3        | 70            | 91,00        | 1353,2        |
| 80              | 63,62              | 832,2              | 80            | 73,29        | 1002,6        | 80            | 82,43        | 1177,2        | 80            | 91,14        | 1356,2        |
| 90              | 63,79              | 835,0              | 90            | 73,45        | 1005,5        | 90            | 82,58        | 1180,2        | 90            | 91,28        | 1359,2        |
| <b>1,3100</b>   | <b>63,95</b>       | <b>837,8</b>       | <b>1,3700</b> | <b>73,60</b> | <b>1008,4</b> | <b>1,4300</b> | <b>82,73</b> | <b>1183,1</b> | <b>1,4900</b> | <b>91,42</b> | <b>1362,2</b> |
| 10              | 64,12              | 840,6              | 10            | 73,76        | 1011,3        | 10            | 82,88        | 1186,0        | 10            | 91,57        | 1365,3        |
| 20              | 64,28              | 843,4              | 20            | 73,92        | 1014,1        | 20            | 83,03        | 1189,0        | 20            | 91,71        | 1368,3        |
| 30              | 64,45              | 846,2              | 30            | 74,07        | 1017,0        | 30            | 83,18        | 1191,9        | 30            | 91,85        | 1371,3        |
| 40              | 64,62              | 849,1              | 40            | 74,23        | 1019,9        | 40            | 83,32        | 1194,0        | 40            | 91,99        | 1374,4        |
| 50              | 64,78              | 851,9              | 50            | 74,38        | 1022,8        | 50            | 83,47        | 1197,8        | 50            | 92,13        | 1377,4        |
| 60              | 64,95              | 854,7              | 60            | 74,54        | 1025,7        | 60            | 83,62        | 1200,8        | 60            | 92,27        | 1380,4        |
| 70              | 65,11              | 857,5              | 70            | 74,69        | 1028,5        | 70            | 83,77        | 1203,8        | 70            | 92,41        | 1383,5        |
| 80              | 65,27              | 860,3              | 80            | 74,85        | 1031,4        | 80            | 83,91        | 1206,7        | 80            | 92,56        | 1386,5        |
| 90              | 65,44              | 863,1              | 90            | 75,01        | 1034,3        | 90            | 84,06        | 1209,7        | 90            | 92,70        | 1389,5        |
| <b>1,3200</b>   | <b>65,60</b>       | <b>866,0</b>       | <b>1,3800</b> | <b>75,16</b> | <b>1037,2</b> | <b>1,4400</b> | <b>84,21</b> | <b>1212,6</b> | <b>1,5000</b> | <b>92,84</b> | <b>1392,6</b> |
| 10              | 65,77              | 868,8              | 10            | 75,31        | 1040,1        | 10            | 84,36        | 1215,6        | 10            | 92,98        | 1395,6        |
| 20              | 65,93              | 871,6              | 20            | 75,47        | 1043,0        | 20            | 84,50        | 1218,5        | 20            | 93,12        | 1398,7        |
| 30              | 66,09              | 874,4              | 30            | 75,62        | 1045,9        | 30            | 84,65        | 1221,5        | 30            | 93,26        | 1401,7        |
| 40 <sup>1</sup> | 66,26 <sup>1</sup> | 877,3 <sup>1</sup> | 40            | 75,78        | 1048,8        | 40            | 84,80        | 1224,5        | 40            | 93,40        | 1404,7        |
| 50              | 66,42              | 880,1              | 50            | 75,93        | 1051,7        | 50            | 84,95        | 1227,4        | 50            | 93,54        | 1407,8        |
| 60              | 66,58              | 882,9              | 60            | 76,09        | 1054,6        | 60            | 85,09        | 1230,4        | 60            | 93,68        | 1410,8        |
| 70              | 66,75              | 885,7              | 70            | 76,24        | 1057,4        | 70            | 85,24        | 1233,4        | 70            | 93,82        | 1413,9        |
| 80              | 66,91              | 888,6              | 80            | 76,39        | 1060,3        | 80            | 85,39        | 1236,3        | 80            | 93,96        | 1416,9        |
| 90              | 67,07              | 891,4              | 90            | 76,55        | 1063,2        | 90            | 85,53        | 1239,3        | 90            | 94,11        | 1420,0        |

<sup>1</sup> Löslichkeitsgrenze der Saccharose in Wasser (66,3%).



| Dichte        | Zucker           |                      | Dichte        | Zucker           |                      | Dichte        | Zucker           |                      | Dichte        | Zucker           |                      |
|---------------|------------------|----------------------|---------------|------------------|----------------------|---------------|------------------|----------------------|---------------|------------------|----------------------|
|               | $\bar{d}^{20/4}$ | %<br>g in<br>1 Liter |               | $\bar{d}^{20/4}$ | %<br>g in<br>1 Liter |               | $\bar{d}^{20/4}$ | %<br>g in<br>1 Liter |               | $\bar{d}^{20/4}$ | %<br>g in<br>1 Liter |
| <b>1,5100</b> | <b>94,25</b>     | <b>1423,0</b>        | 20            | 95,91            | 1459,7               | 40            | 97,57            | 1496,7               | 60            | 99,21            | 1533,8               |
| 10            | 94,38            | 1426,1               | 30            | 96,05            | 1462,8               | 50            | 97,70            | 1499,8               | 70            | 99,35            | 1536,9               |
| 20            | 94,52            | 1429,1               | 40            | 96,19            | 1465,9               | 60            | 97,84            | 1502,9               | 80            | 99,48            | 1540,0               |
| 30            | 94,66            | 1432,2               | 50            | 96,33            | 1469,0               | 70            | 97,98            | 1505,9               | 90            | 99,62            | 1543,1               |
| 40            | 94,80            | 1435,2               | 60            | 96,46            | 1472,0               | 80            | 98,11            | 1509,0               | <b>1,5500</b> | <b>99,75</b>     | <b>1546,2</b>        |
| 50            | 94,94            | 1438,3               | 70            | 96,60            | 1475,1               | 90            | 98,25            | 1512,1               |               |                  |                      |
| 60            | 95,08            | 1441,4               | 80            | 96,74            | 1478,2               | <b>1,5400</b> | <b>98,39</b>     | <b>1515,2</b>        | 10            | 99,89            | 1549,3               |
| 70            | 95,21            | 1444,4               | 90            | 96,88            | 1481,3               |               |                  |                      | 18            | 100,00           | 1551,8               |
| 80            | 95,35            | 1447,5               | <b>1,5300</b> | <b>97,01</b>     | <b>1484,3</b>        | 10            | 98,53            | 1518,3               |               |                  |                      |
| 90            | 95,49            | 1450,5               |               |                  |                      | 20            | 98,66            | 1521,4               |               |                  |                      |
| <b>1,5200</b> | <b>95,63</b>     | <b>1453,6</b>        | 20            | 97,15            | 1487,4               | 30            | 98,80            | 1524,5               |               |                  |                      |
| 10            | 95,77            | 1456,7               | 30            | 97,29            | 1490,5               | 40            | 98,94            | 1527,6               |               |                  |                      |
|               |                  |                      |               | 97,43            | 1493,6               | 50            | 99,07            | 1530,7               |               |                  |                      |

Tabelle III<sup>1</sup>. Bestimmung der Glucose nach MEISSL-ALLIHN (vgl. S. 862).

| Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 1            | 0,6           | 31           | 16,5          | 61           | 31,3          | 91           | 46,4          | 121          | 61,6          | 151          | 77,0          |
| 2            | 1,2           | 32           | 17,0          | 62           | 31,8          | 92           | 46,9          | 122          | 62,1          | 152          | 77,5          |
| 3            | 1,8           | 33           | 17,5          | 63           | 32,3          | 93           | 47,4          | 123          | 62,6          | 153          | 78,1          |
| 4            | 2,4           | 34           | 18,0          | 64           | 32,8          | 94           | 47,9          | 124          | 63,1          | 154          | 78,6          |
| 5            | 3,0           | 35           | 18,5          | 65           | 33,3          | 95           | 48,4          | 125          | 63,7          | 155          | 79,1          |
| 6            | 3,6           | 36           | 18,9          | 66           | 33,8          | 96           | 48,9          | 126          | 64,2          | 156          | 79,6          |
| 7            | 4,2           | 37           | 19,4          | 67           | 34,3          | 97           | 49,4          | 127          | 64,7          | 157          | 80,1          |
| 8            | 4,8           | 38           | 19,9          | 68           | 34,8          | 98           | 49,9          | 128          | 65,2          | 158          | 80,7          |
| 9            | 5,4           | 39           | 20,4          | 69           | 35,3          | 99           | 50,4          | 129          | 65,7          | 159          | 81,2          |
| 10           | 6,1           | 40           | 20,9          | 70           | 35,8          | 100          | 50,9          | 130          | 66,2          | 160          | 81,7          |
| 11           | 6,6           | 41           | 21,4          | 71           | 36,3          | 101          | 51,4          | 131          | 66,7          | 161          | 82,2          |
| 12           | 7,1           | 42           | 21,9          | 72           | 36,8          | 102          | 51,9          | 132          | 67,2          | 162          | 82,7          |
| 13           | 7,6           | 43           | 22,4          | 73           | 37,3          | 103          | 52,4          | 133          | 67,7          | 163          | 83,3          |
| 14           | 8,1           | 44           | 22,9          | 74           | 37,8          | 104          | 52,9          | 134          | 68,2          | 164          | 83,8          |
| 15           | 8,6           | 45           | 23,4          | 75           | 38,3          | 105          | 53,5          | 135          | 68,8          | 165          | 84,3          |
| 16           | 9,0           | 46           | 23,9          | 76           | 38,8          | 106          | 54,0          | 136          | 69,3          | 166          | 84,8          |
| 17           | 9,5           | 47           | 24,4          | 77           | 39,3          | 107          | 54,5          | 137          | 69,8          | 167          | 85,3          |
| 18           | 10,0          | 48           | 24,9          | 78           | 39,8          | 108          | 55,0          | 138          | 70,3          | 168          | 85,9          |
| 19           | 10,5          | 49           | 25,4          | 79           | 40,3          | 109          | 55,5          | 139          | 70,8          | 169          | 86,4          |
| 20           | 11,0          | 50           | 25,9          | 80           | 40,8          | 110          | 56,0          | 140          | 71,3          | 170          | 86,9          |
| 21           | 11,5          | 51           | 26,4          | 81           | 41,3          | 111          | 56,5          | 141          | 71,8          | 171          | 87,4          |
| 22           | 12,0          | 52           | 26,9          | 82           | 41,8          | 112          | 57,0          | 142          | 72,3          | 172          | 87,9          |
| 23           | 12,5          | 53           | 27,4          | 83           | 42,3          | 113          | 57,5          | 143          | 72,9          | 173          | 88,5          |
| 24           | 13,0          | 54           | 27,9          | 84           | 42,8          | 114          | 58,0          | 144          | 73,4          | 174          | 89,0          |
| 25           | 13,5          | 55           | 28,4          | 85           | 43,4          | 115          | 58,6          | 145          | 73,9          | 175          | 89,5          |
| 26           | 14,0          | 56           | 28,8          | 86           | 43,9          | 116          | 59,1          | 146          | 74,4          | 176          | 90,0          |
| 27           | 14,5          | 57           | 29,3          | 87           | 44,4          | 117          | 59,6          | 147          | 74,9          | 177          | 90,5          |
| 28           | 15,0          | 58           | 29,8          | 88           | 44,9          | 118          | 60,1          | 148          | 75,5          | 178          | 91,1          |
| 29           | 15,5          | 59           | 30,3          | 89           | 45,4          | 119          | 60,6          | 149          | 76,0          | 179          | 91,6          |
| 30           | 16,0          | 60           | 30,8          | 90           | 45,9          | 120          | 61,1          | 150          | 76,5          | 180          | 92,1          |

<sup>1</sup> Diese und die 4 folgenden Tabellen sind entnommen aus E. WEINS Tabellen zur quantitativen Bestimmung der Zuckerarten, Stuttgart 1888. Die darin nicht enthaltenen Zahlenwerte für kleinere Kupfermengen (1—9 mg) wurden durch Extrapolation ergänzt.

| Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg | Kupfer<br>mg | Glucose<br>mg |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 181          | 92,6          | 228          | 117,4         | 274          | 142,2         | 321          | 168,1         | 369          | 195,1         | 416          | 222,2         |
| 182          | 93,1          | 229          | 118,0         | 275          | 142,8         | 322          | 168,6         | 370          | 195,7         | 417          | 222,8         |
| 183          | 93,7          | 230          | 118,5         | 276          | 143,3         | 323          | 169,2         |              |               | 418          | 223,2         |
| 184          | 94,2          |              |               | 277          | 143,9         | 324          | 169,7         | 371          | 196,3         | 419          | 223,9         |
| 185          | 94,7          | 231          | 119,0         | 278          | 144,4         | 325          | 170,3         | 372          | 196,8         | 420          | 224,5         |
| 186          | 95,2          | 232          | 119,6         | 279          | 145,0         | 326          | 170,9         | 373          | 197,4         |              |               |
| 187          | 95,7          | 233          | 120,1         | 280          | 145,5         | 327          | 171,4         | 374          | 198,0         | 421          | 225,1         |
| 188          | 96,3          | 234          | 120,7         |              |               | 328          | 172,0         | 375          | 198,6         | 422          | 225,7         |
| 189          | 96,8          | 235          | 121,2         | 281          | 146,1         | 329          | 172,5         | 376          | 199,1         | 423          | 226,3         |
| 190          | 97,3          | 236          | 121,7         | 282          | 146,6         | 330          | 173,1         | 377          | 199,7         | 424          | 226,9         |
|              |               | 237          | 122,3         | 283          | 147,2         |              |               | 378          | 200,3         | 425          | 227,5         |
| 191          | 97,8          | 238          | 122,8         | 284          | 147,7         | 331          | 173,7         | 379          | 200,8         | 426          | 228,0         |
| 192          | 98,4          | 239          | 123,4         | 285          | 148,3         | 332          | 174,2         | 380          | 201,4         | 427          | 228,6         |
| 193          | 98,9          | 240          | 123,9         | 286          | 148,8         | 333          | 174,8         |              |               | 428          | 229,2         |
| 194          | 99,4          |              |               | 287          | 149,4         | 334          | 175,3         | 381          | 202,0         | 429          | 229,8         |
| 195          | 100,0         | 241          | 124,4         | 288          | 149,9         | 335          | 175,9         | 382          | 202,5         | 430          | 230,4         |
| 196          | 100,5         | 242          | 125,0         | 289          | 150,0         | 336          | 176,5         | 383          | 203,1         |              |               |
| 197          | 101,0         | 243          | 125,5         | 290          | 151,0         | 337          | 177,0         | 384          | 203,7         | 431          | 231,0         |
| 198          | 101,5         | 244          | 126,0         |              |               | 338          | 177,6         | 385          | 204,3         | 432          | 231,6         |
| 199          | 102,0         | 245          | 126,6         | 291          | 151,6         | 339          | 178,1         | 386          | 204,8         | 433          | 232,2         |
| 200          | 102,6         | 246          | 127,1         | 292          | 152,1         | 340          | 178,7         | 387          | 205,4         | 434          | 232,8         |
|              |               | 247          | 127,6         | 293          | 152,7         |              |               | 388          | 206,0         | 435          | 233,4         |
| 201          | 103,2         | 248          | 128,1         | 294          | 153,2         | 341          | 179,3         | 389          | 206,5         | 436          | 233,9         |
| 202          | 103,7         | 249          | 128,7         | 295          | 153,8         | 342          | 179,8         | 390          | 207,1         | 437          | 234,5         |
| 203          | 104,2         | 250          | 129,2         | 296          | 154,3         | 343          | 180,4         |              |               | 438          | 235,1         |
| 204          | 104,7         |              |               | 297          | 154,9         | 344          | 180,9         | 391          | 207,7         | 439          | 235,7         |
| 205          | 105,3         | 251          | 129,7         | 298          | 155,4         | 345          | 181,5         | 392          | 208,3         | 440          | 236,3         |
| 206          | 105,8         | 252          | 130,3         | 299          | 156,0         | 346          | 182,1         | 393          | 208,8         |              |               |
| 207          | 106,3         | 253          | 130,8         | 300          | 156,5         | 347          | 182,6         | 394          | 209,4         | 441          | 236,9         |
| 208          | 106,8         | 254          | 131,4         |              |               | 348          | 183,2         | 395          | 210,0         | 442          | 237,5         |
| 209          | 107,4         | 255          | 131,9         | 301          | 157,1         | 349          | 183,7         | 396          | 210,6         | 443          | 238,1         |
| 210          | 107,9         | 256          | 132,4         | 302          | 157,6         | 350          | 184,3         | 397          | 211,2         | 444          | 238,7         |
|              |               | 257          | 133,0         | 303          | 158,2         |              |               | 398          | 211,7         | 445          | 239,3         |
| 211          | 108,4         | 258          | 133,5         | 304          | 158,7         | 351          | 184,9         | 399          | 212,3         | 446          | 239,8         |
| 212          | 109,0         | 259          | 134,1         | 305          | 159,3         | 352          | 185,4         | 400          | 212,9         | 447          | 240,4         |
| 213          | 109,5         | 260          | 134,6         | 306          | 159,8         | 353          | 186,0         |              |               | 448          | 241,0         |
| 214          | 110,0         |              |               | 307          | 160,4         | 354          | 186,6         | 401          | 213,5         | 449          | 241,6         |
| 215          | 110,6         | 261          | 135,1         | 308          | 160,9         | 355          | 187,2         | 402          | 214,1         | 450          | 242,2         |
| 216          | 111,1         | 262          | 135,7         | 309          | 161,5         | 356          | 187,7         | 403          | 214,6         | 451          | 242,8         |
| 217          | 111,6         | 263          | 136,2         | 310          | 162,0         | 357          | 188,3         | 404          | 215,2         | 452          | 243,4         |
| 218          | 112,1         | 264          | 136,8         |              |               | 358          | 188,9         | 405          | 215,8         | 453          | 244,0         |
| 219          | 112,7         | 265          | 137,3         | 311          | 162,6         | 359          | 189,4         | 406          | 216,4         | 454          | 244,6         |
| 220          | 113,2         | 266          | 137,8         | 312          | 163,1         | 360          | 190,0         | 407          | 217,0         | 455          | 245,2         |
|              |               | 267          | 138,4         | 313          | 163,7         |              |               | 408          | 217,5         | 456          | 245,7         |
| 221          | 113,7         | 268          | 138,9         | 314          | 164,2         | 361          | 190,6         | 409          | 218,1         | 457          | 246,3         |
| 222          | 114,3         | 269          | 139,5         | 315          | 164,8         | 362          | 191,1         | 410          | 218,7         | 458          | 246,9         |
| 223          | 114,8         | 270          | 140,0         | 316          | 165,3         | 363          | 191,7         |              |               | 459          | 247,5         |
| 224          | 115,3         |              |               | 317          | 165,9         | 364          | 192,3         | 411          | 219,3         | 460          | 248,1         |
| 225          | 115,9         | 271          | 140,6         | 318          | 166,4         | 365          | 192,9         | 412          | 219,9         |              |               |
| 226          | 116,4         | 272          | 141,1         | 319          | 167,0         | 366          | 193,4         | 413          | 220,5         | 461          | 248,7         |
| 227          | 116,9         | 273          | 141,7         | 320          | 167,5         | 367          | 194,0         | 414          | 221,0         | 462          | 249,3         |
|              |               |              |               |              |               | 368          | 194,6         | 415          | 221,6         | 463          | 249,9         |

Tabelle IV. Bestimmung des Invertzuckers nach E. MEISSL<sup>1</sup> (vgl. S. 862).

| Kupfer | Invert- | Kupfer | Invert- | Kupfer | Invert- | Kupfer | Invert- | Kupfer | Invert- | Kupfer | Invert- |
|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|
| mg     | zucker  | mg     | zucker  | mg     | zucker  | mg     | zucker  | mg     | zucker  | mg     | zucker  |
|        | mg      |        | mg      |        | mg      |        | mg      |        | mg      |        | mg      |
| 1      | 0,5     | 51     | 26,2    | 101    | 52,7    | 151    | 79,4    | 201    | 106,8   | 251    | 135,2   |
| 2      | 1,0     | 52     | 26,7    | 102    | 53,2    | 152    | 80,0    | 202    | 107,4   | 252    | 135,8   |
| 3      | 1,5     | 53     | 27,3    | 103    | 53,7    | 153    | 80,5    | 203    | 107,9   | 253    | 136,3   |
| 4      | 2,0     | 54     | 27,8    | 104    | 54,3    | 154    | 81,0    | 204    | 108,5   | 254    | 136,9   |
| 5      | 2,5     | 55     | 28,3    | 105    | 54,8    | 155    | 81,6    | 205    | 109,1   | 255    | 137,5   |
| 6      | 3,0     | 56     | 28,8    | 106    | 55,3    | 156    | 82,1    | 206    | 109,6   | 256    | 138,1   |
| 7      | 3,5     | 57     | 29,4    | 107    | 55,9    | 157    | 82,7    | 207    | 110,2   | 257    | 138,6   |
| 8      | 4,1     | 58     | 29,9    | 108    | 56,4    | 158    | 83,2    | 208    | 110,8   | 258    | 139,2   |
| 9      | 4,6     | 59     | 30,4    | 109    | 56,9    | 159    | 83,8    | 209    | 111,3   | 259    | 139,8   |
| 10     | 5,1     | 60     | 30,9    | 110    | 57,5    | 160    | 84,3    | 210    | 111,9   | 260    | 140,4   |
| 11     | 5,6     | 61     | 31,5    | 111    | 58,0    | 161    | 84,8    | 211    | 112,5   | 261    | 140,9   |
| 12     | 6,1     | 62     | 32,0    | 112    | 58,5    | 162    | 85,4    | 212    | 113,0   | 262    | 141,5   |
| 13     | 6,6     | 63     | 32,5    | 113    | 59,1    | 163    | 85,9    | 213    | 113,6   | 263    | 142,1   |
| 14     | 7,1     | 64     | 33,0    | 114    | 59,6    | 164    | 86,5    | 214    | 114,2   | 264    | 142,7   |
| 15     | 7,6     | 65     | 33,6    | 115    | 60,1    | 165    | 87,0    | 215    | 114,7   | 265    | 143,2   |
| 16     | 8,2     | 66     | 34,1    | 116    | 60,7    | 166    | 87,6    | 216    | 115,3   | 266    | 143,8   |
| 17     | 8,7     | 67     | 34,6    | 117    | 61,2    | 167    | 88,1    | 217    | 115,8   | 267    | 144,4   |
| 18     | 9,2     | 68     | 35,1    | 118    | 61,7    | 168    | 88,6    | 218    | 116,4   | 268    | 144,9   |
| 19     | 9,7     | 69     | 35,7    | 119    | 62,3    | 169    | 89,2    | 219    | 117,0   | 269    | 145,5   |
| 20     | 10,2    | 70     | 36,2    | 120    | 62,8    | 170    | 89,7    | 220    | 117,5   | 270    | 146,1   |
| 21     | 10,7    | 71     | 36,7    | 121    | 63,3    | 171    | 90,3    | 221    | 118,1   | 271    | 146,7   |
| 22     | 11,2    | 72     | 37,2    | 122    | 63,9    | 172    | 90,8    | 222    | 118,7   | 272    | 147,2   |
| 23     | 11,7    | 73     | 37,8    | 123    | 64,4    | 173    | 91,4    | 223    | 119,2   | 273    | 147,8   |
| 24     | 12,3    | 74     | 38,3    | 124    | 64,9    | 174    | 91,9    | 224    | 119,8   | 274    | 148,4   |
| 25     | 12,8    | 75     | 38,8    | 125    | 65,5    | 175    | 92,4    | 225    | 120,4   | 275    | 149,0   |
| 26     | 13,3    | 76     | 39,4    | 126    | 66,0    | 176    | 93,0    | 226    | 120,9   | 276    | 149,5   |
| 27     | 13,8    | 77     | 39,9    | 127    | 66,5    | 177    | 93,5    | 227    | 121,5   | 277    | 150,1   |
| 28     | 14,3    | 78     | 40,4    | 128    | 67,1    | 178    | 94,1    | 228    | 122,1   | 278    | 150,7   |
| 29     | 14,8    | 79     | 41,0    | 129    | 67,6    | 179    | 94,6    | 229    | 122,6   | 279    | 151,3   |
| 30     | 15,3    | 80     | 41,5    | 130    | 68,1    | 180    | 95,2    | 230    | 123,2   | 280    | 151,9   |
| 31     | 15,8    | 81     | 42,0    | 131    | 68,7    | 181    | 95,7    | 231    | 123,6   | 281    | 152,5   |
| 32     | 16,4    | 82     | 42,5    | 132    | 69,2    | 182    | 96,2    | 232    | 124,3   | 282    | 153,1   |
| 33     | 16,9    | 83     | 43,1    | 133    | 69,7    | 183    | 96,8    | 233    | 124,9   | 283    | 153,7   |
| 34     | 17,4    | 84     | 43,6    | 134    | 70,3    | 184    | 97,3    | 234    | 125,5   | 284    | 154,3   |
| 35     | 17,9    | 85     | 44,1    | 135    | 70,8    | 185    | 97,8    | 235    | 126,0   | 285    | 154,9   |
| 36     | 18,4    | 86     | 44,7    | 136    | 71,3    | 186    | 98,4    | 236    | 126,6   | 286    | 155,5   |
| 37     | 19,0    | 87     | 45,2    | 137    | 71,9    | 187    | 99,0    | 237    | 127,2   | 287    | 156,1   |
| 38     | 19,5    | 88     | 45,7    | 138    | 72,4    | 188    | 99,5    | 238    | 127,8   | 288    | 156,7   |
| 39     | 20,0    | 89     | 46,3    | 139    | 72,9    | 189    | 100,1   | 239    | 128,3   | 289    | 157,2   |
| 40     | 20,5    | 90     | 46,9    | 140    | 73,5    | 190    | 100,6   | 240    | 128,9   | 290    | 157,8   |
| 41     | 21,0    | 91     | 47,4    | 141    | 74,0    | 191    | 101,2   | 241    | 129,5   | 291    | 158,4   |
| 42     | 21,5    | 92     | 47,9    | 142    | 74,5    | 192    | 101,7   | 242    | 130,0   | 292    | 159,0   |
| 43     | 22,1    | 93     | 48,4    | 143    | 75,1    | 193    | 102,3   | 243    | 130,6   | 293    | 159,6   |
| 44     | 22,6    | 94     | 48,9    | 144    | 75,6    | 194    | 102,9   | 244    | 131,2   | 294    | 160,2   |
| 45     | 23,1    | 95     | 49,5    | 145    | 76,1    | 195    | 103,4   | 245    | 131,8   | 295    | 160,8   |
| 46     | 23,6    | 96     | 50,0    | 146    | 76,7    | 196    | 104,0   | 246    | 132,3   | 296    | 161,4   |
| 47     | 24,2    | 97     | 50,5    | 147    | 77,2    | 197    | 104,6   | 247    | 132,9   | 297    | 162,0   |
| 48     | 24,7    | 98     | 51,1    | 148    | 77,8    | 198    | 105,1   | 248    | 133,5   | 298    | 162,6   |
| 49     | 25,2    | 99     | 51,6    | 149    | 78,3    | 199    | 105,7   | 249    | 134,1   | 299    | 163,2   |
| 50     | 25,7    | 100    | 52,1    | 150    | 78,9    | 200    | 106,3   | 250    | 134,6   | 300    | 163,8   |

<sup>1</sup> Die Zahlenwerte für 1—89 mg Kupfer wurden durch Extrapolation berechnet und hinzugefügt.

| Kupfer | Invert-<br>zucker | Kupfer | Invert-<br>zucker | Kupfer | Invert-<br>zucker | Kupfer | Invert-<br>zucker | Kupfer | Invert-<br>zucker | Kupfer | Invert-<br>zucker |
|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|
| mg     | mg                | mg     | mg                | mg     | mg                | mg     | mg                | mg     | mg                | mg     | mg                |
| 301    | 164,4             | 323    | 177,4             | 345    | 190,8             | 367    | 204,2             | 388    | 217,4             | 409    | 231,4             |
| 302    | 165,0             | 324    | 178,0             | 346    | 191,4             | 368    | 204,8             | 389    | 218,0             | 410    | 232,1             |
| 303    | 165,6             | 325    | 178,6             | 347    | 192,0             | 369    | 205,5             | 390    | 218,7             | 411    | 232,8             |
| 304    | 166,2             | 326    | 179,2             | 348    | 192,6             | 370    | 206,1             |        |                   | 412    | 233,5             |
| 305    | 166,8             | 327    | 179,8             | 349    | 193,2             |        |                   | 391    | 219,3             | 413    | 234,3             |
| 306    | 167,3             | 328    | 180,4             | 350    | 193,8             | 371    | 206,7             | 392    | 219,9             | 414    | 235,0             |
| 307    | 167,9             | 329    | 181,0             |        |                   | 372    | 207,3             | 393    | 220,5             | 415    | 235,7             |
| 308    | 168,5             | 330    | 181,6             | 351    | 194,4             | 373    | 208,0             | 394    | 221,2             | 416    | 236,4             |
| 309    | 169,1             |        |                   | 352    | 195,0             | 274    | 208,6             | 395    | 221,8             | 417    | 237,1             |
| 310    | 169,7             | 331    | 182,2             | 353    | 195,6             | 375    | 209,2             | 396    | 222,4             | 418    | 237,8             |
|        |                   | 332    | 182,8             | 354    | 196,2             | 376    | 209,9             | 397    | 223,1             | 419    | 238,5             |
| 311    | 170,3             | 333    | 183,5             | 355    | 196,8             | 377    | 210,5             | 398    | 223,7             | 420    | 239,2             |
| 312    | 170,9             | 334    | 184,1             | 356    | 197,4             | 378    | 211,1             | 399    | 224,3             |        |                   |
| 313    | 171,5             | 335    | 184,7             | 357    | 198,0             | 379    | 211,7             | 400    | 224,9             | 421    | 239,9             |
| 314    | 172,1             | 336    | 185,4             | 358    | 198,6             | 380    | 212,4             |        |                   | 422    | 240,6             |
| 315    | 172,7             | 337    | 186,0             | 359    | 199,2             |        |                   | 401    | 225,7             | 423    | 241,3             |
| 316    | 173,3             | 338    | 186,6             | 360    | 199,8             | 381    | 213,0             | 402    | 226,4             | 424    | 242,0             |
| 317    | 173,8             | 339    | 187,2             |        |                   | 382    | 213,6             | 403    | 227,1             | 425    | 242,7             |
| 318    | 174,5             | 340    | 187,8             | 361    | 200,4             | 383    | 214,3             | 404    | 227,8             | 426    | 243,4             |
| 319    | 175,1             |        |                   | 362    | 201,1             | 384    | 214,9             | 405    | 228,6             | 427    | 244,1             |
| 320    | 175,6             | 341    | 188,4             | 363    | 201,7             | 385    | 215,5             | 406    | 229,3             | 428    | 244,9             |
|        |                   | 342    | 189,0             | 364    | 202,3             | 386    | 216,1             | 407    | 230,0             | 429    | 245,6             |
| 321    | 176,2             | 343    | 189,6             | 365    | 203,0             | 387    | 216,8             | 408    | 230,7             | 430    | 246,3             |
| 322    | 176,8             | 344    | 190,2             | 366    | 203,6             |        |                   |        |                   |        |                   |

Tabelle V. Bestimmung der Maltose nach E. WEIN<sup>1</sup> (vgl. S. 863).

| Kupfer | Maltose | Kupfer | Maltose | Kupfer | Maltose | Kupfer | Maltose | Kupfer | Maltose | Kupfer | Maltose |
|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|
| mg     | mg      | mg     | mg      | mg     | mg      | mg     | mg      | mg     | mg      | mg     | mg      |
| 1      | 0,8     | 26     | 21,9    | 51     | 43,5    | 76     | 65,4    | 101    | 87,5    | 126    | 109,8   |
| 2      | 1,7     | 27     | 22,8    | 52     | 44,4    | 77     | 66,2    | 102    | 88,4    | 127    | 110,7   |
| 3      | 2,5     | 28     | 23,6    | 53     | 45,2    | 78     | 67,1    | 103    | 89,2    | 128    | 111,6   |
| 4      | 3,4     | 29     | 24,5    | 54     | 46,1    | 79     | 68,0    | 104    | 90,1    | 129    | 112,5   |
| 5      | 4,2     | 30     | 25,3    | 55     | 47,0    | 80     | 68,9    | 105    | 91,0    | 130    | 113,4   |
| 6      | 5,0     |        |         | 56     | 47,8    |        |         | 106    | 91,9    |        |         |
| 7      | 5,9     | 31     | 26,1    | 57     | 48,7    | 81     | 69,7    | 107    | 92,8    | 131    | 114,3   |
| 8      | 6,7     | 32     | 27,0    | 58     | 49,6    | 82     | 70,6    | 108    | 93,7    | 132    | 115,2   |
| 9      | 7,6     | 33     | 27,9    | 59     | 50,4    | 83     | 71,5    | 109    | 94,6    | 133    | 116,1   |
| 10     | 8,4     | 34     | 28,7    | 60     | 51,3    | 84     | 72,4    | 110    | 95,5    | 134    | 117,0   |
|        |         | 35     | 29,6    |        |         | 85     | 73,2    |        |         | 135    | 117,9   |
| 11     | 9,2     | 36     | 30,5    | 61     | 52,2    | 86     | 74,1    | 111    | 96,4    | 136    | 118,8   |
| 12     | 10,1    | 37     | 31,3    | 62     | 53,1    | 87     | 75,0    | 112    | 97,3    | 137    | 119,7   |
| 13     | 10,9    | 38     | 32,2    | 63     | 53,9    | 88     | 75,9    | 113    | 98,1    | 138    | 120,6   |
| 14     | 11,7    | 39     | 33,1    | 64     | 54,8    | 89     | 76,8    | 114    | 99,0    | 139    | 121,5   |
| 15     | 12,6    | 40     | 33,9    | 65     | 55,7    | 90     | 77,7    | 115    | 99,9    | 140    | 122,4   |
| 16     | 13,5    |        |         | 66     | 56,6    |        |         | 116    | 100,8   |        |         |
| 17     | 14,3    | 41     | 34,8    | 67     | 57,4    | 91     | 78,6    | 117    | 101,7   | 141    | 123,3   |
| 18     | 15,2    | 42     | 35,7    | 68     | 58,3    | 92     | 79,5    | 118    | 102,6   | 142    | 124,2   |
| 19     | 16,0    | 43     | 36,5    | 69     | 59,2    | 93     | 80,3    | 119    | 103,5   | 143    | 125,1   |
| 20     | 16,8    | 44     | 37,4    | 70     | 60,1    | 94     | 81,2    | 120    | 104,4   | 144    | 126,0   |
|        |         | 45     | 38,3    |        |         | 95     | 82,1    |        |         | 145    | 126,9   |
| 21     | 17,7    | 46     | 39,1    | 71     | 61,1    | 96     | 83,0    | 121    | 105,3   | 146    | 127,8   |
| 22     | 18,5    | 47     | 40,0    | 72     | 61,8    | 97     | 83,9    | 122    | 106,2   | 147    | 128,7   |
| 23     | 19,4    | 48     | 40,9    | 73     | 62,7    | 98     | 84,8    | 123    | 107,1   | 148    | 129,6   |
| 24     | 20,2    | 49     | 41,8    | 74     | 63,6    | 99     | 85,7    | 124    | 108,0   | 149    | 130,5   |
| 25     | 21,1    | 50     | 42,6    | 75     | 64,5    | 100    | 86,6    | 125    | 108,9   | 150    | 131,4   |

<sup>1</sup> Der von WEIN nicht angegebenen Zahlenwerte für 1—29 mg Kupfer wurden durch Extrapolation ergänzt.

| Kupfer<br>mg | Maltose<br>mg | Kupfer<br>mg | Maltose<br>mg | Kupfer<br>mg | Maltose<br>mg | Kupfer<br>mg | Maltose<br>mg | Kupfer<br>mg | Maltose<br>mg | Kupfer<br>mg | Maltose<br>mg |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 151          | 132,3         | 176          | 154,7         | 201          | 177,0         | 226          | 199,3         | 251          | 221,7         | 276          | 244,2         |
| 152          | 133,2         | 177          | 155,6         | 202          | 177,9         | 227          | 200,2         | 252          | 222,6         | 277          | 245,1         |
| 153          | 134,1         | 178          | 156,5         | 203          | 178,7         | 228          | 201,1         | 253          | 223,5         | 278          | 246,0         |
| 154          | 135,0         | 179          | 157,4         | 204          | 179,6         | 229          | 202,0         | 254          | 224,4         | 279          | 246,9         |
| 155          | 135,9         | 180          | 158,3         | 205          | 180,5         | 230          | 202,9         | 255          | 225,3         | 280          | 247,8         |
| 156          | 136,8         |              |               | 206          | 181,4         |              |               | 256          | 226,2         |              |               |
| 157          | 137,7         | 181          | 159,2         | 207          | 182,3         | 231          | 203,8         | 257          | 227,1         | 281          | 248,7         |
| 158          | 138,6         | 182          | 160,1         | 208          | 183,2         | 232          | 204,7         | 258          | 228,0         | 282          | 249,6         |
| 159          | 139,5         | 183          | 160,9         | 209          | 184,1         | 233          | 205,6         | 259          | 228,9         | 283          | 250,4         |
| 160          | 140,4         | 184          | 161,8         | 210          | 185,0         | 234          | 206,5         | 260          | 229,8         | 284          | 251,3         |
|              |               | 185          | 162,7         |              |               | 235          | 207,4         |              |               | 285          | 252,2         |
| 161          | 141,3         | 186          | 163,6         | 211          | 185,9         | 236          | 208,3         | 261          | 230,7         | 286          | 253,1         |
| 162          | 142,2         | 187          | 164,5         | 212          | 186,8         | 237          | 209,1         | 262          | 231,6         | 287          | 254,0         |
| 163          | 143,1         | 188          | 165,4         | 213          | 187,7         | 238          | 210,0         | 263          | 232,5         | 288          | 254,9         |
| 164          | 144,0         | 189          | 166,3         | 214          | 188,6         | 239          | 210,9         | 264          | 233,4         | 289          | 255,8         |
| 165          | 144,9         | 190          | 167,2         | 215          | 189,5         | 240          | 211,8         | 265          | 234,3         | 290          | 256,6         |
| 166          | 145,8         |              |               | 216          | 190,4         |              |               | 266          | 235,2         |              |               |
| 167          | 146,7         | 191          | 168,1         | 217          | 191,2         | 241          | 212,7         | 267          | 236,1         | 291          | 257,5         |
| 168          | 147,6         | 192          | 169,0         | 218          | 192,1         | 242          | 213,6         | 268          | 237,0         | 292          | 258,4         |
| 169          | 148,5         | 193          | 169,8         | 219          | 193,0         | 243          | 214,5         | 269          | 237,9         | 293          | 259,3         |
| 170          | 149,4         | 194          | 170,7         | 220          | 193,9         | 244          | 215,4         | 270          | 238,8         | 294          | 260,2         |
|              |               | 195          | 171,6         |              |               | 245          | 216,3         |              |               | 295          | 261,1         |
| 171          | 150,3         | 196          | 172,5         | 221          | 194,8         | 246          | 217,2         | 271          | 239,7         | 296          | 262,0         |
| 172          | 151,2         | 197          | 173,4         | 222          | 195,7         | 247          | 218,1         | 272          | 240,6         | 297          | 262,8         |
| 173          | 152,0         | 198          | 174,3         | 223          | 196,6         | 248          | 219,0         | 273          | 241,5         | 298          | 263,7         |
| 174          | 152,9         | 199          | 175,2         | 224          | 197,5         | 249          | 219,9         | 274          | 242,4         | 299          | 264,6         |
| 175          | 153,8         | 200          | 176,1         | 225          | 198,4         | 250          | 220,8         | 275          | 243,3         | 300          | 265,5         |

Tabelle VI. Bestimmung der Lactose nach FR. SOXHLET<sup>1</sup> (vgl. S. 863).

| Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 1            | 0,7           | 21           | 14,8          | 41           | 29,0          | 61           | 43,3          | 81           | 57,8          | 101          | 72,4          |
| 2            | 1,4           | 22           | 15,5          | 42           | 29,7          | 62           | 44,0          | 82           | 58,5          | 102          | 73,1          |
| 3            | 2,1           | 23           | 16,2          | 43           | 30,4          | 63           | 44,7          | 83           | 59,2          | 103          | 73,8          |
| 4            | 2,8           | 24           | 16,9          | 44           | 31,1          | 64           | 45,5          | 84           | 59,9          | 104          | 74,6          |
| 5            | 3,5           | 25           | 17,6          | 45           | 31,8          | 65           | 46,2          | 85           | 60,7          | 105          | 75,3          |
| 6            | 4,2           | 26           | 18,3          | 46           | 32,5          | 66           | 46,9          | 86           | 61,4          | 106          | 76,1          |
| 7            | 4,9           | 27           | 19,0          | 47           | 33,3          | 67           | 47,6          | 87           | 62,1          | 107          | 76,8          |
| 8            | 5,6           | 28           | 19,7          | 48           | 34,0          | 68           | 48,3          | 88           | 62,9          | 108          | 77,6          |
| 9            | 6,3           | 29           | 20,4          | 49           | 34,7          | 69           | 49,1          | 89           | 63,6          | 109          | 78,3          |
| 10           | 7,0           | 30           | 21,1          | 50           | 35,4          | 70           | 49,8          | 90           | 64,3          | 110          | 79,0          |
| 11           | 7,7           | 31           | 21,9          | 51           | 36,1          | 71           | 50,5          | 91           | 65,0          | 111          | 79,8          |
| 12           | 8,4           | 32           | 22,6          | 52           | 36,8          | 72           | 51,2          | 92           | 65,8          | 112          | 80,5          |
| 13           | 9,1           | 33           | 23,3          | 53           | 37,6          | 73           | 52,0          | 93           | 66,5          | 113          | 81,3          |
| 14           | 9,8           | 34           | 24,0          | 54           | 38,3          | 74           | 52,7          | 94           | 67,2          | 114          | 82,0          |
| 15           | 10,5          | 35           | 24,7          | 55           | 39,0          | 75           | 53,4          | 95           | 68,0          | 115          | 82,7          |
| 16           | 11,2          | 36           | 25,4          | 56           | 39,7          | 76           | 54,1          | 96           | 68,7          | 116          | 83,5          |
| 17           | 11,9          | 37           | 26,1          | 57           | 40,4          | 77           | 54,9          | 97           | 69,4          | 117          | 84,2          |
| 18           | 12,6          | 38           | 26,8          | 58           | 41,1          | 78           | 55,6          | 98           | 70,2          | 118          | 85,0          |
| 19           | 13,4          | 39           | 27,5          | 59           | 41,9          | 79           | 56,3          | 99           | 70,9          | 119          | 85,7          |
| 20           | 14,1          | 40           | 28,2          | 60           | 42,6          | 80           | 57,0          | 100          | 71,6          | 120          | 86,4          |

<sup>1</sup> Die Zahlenwerte für 1—99 mg Kupfer wurden durch Extrapolation berechnet und hinzugefügt.

| Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg | Kupfer<br>mg | Lactose<br>mg |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 121          | 87,2          | 168          | 122,4         | 214          | 157,5         | 261          | 193,3         | 308          | 230,6         | 354          | 267,2         |
| 122          | 87,9          | 169          | 123,2         | 215          | 158,2         | 262          | 194,1         | 309          | 231,4         | 355          | 268,0         |
| 123          | 88,7          | 170          | 123,9         | 216          | 159,0         | 263          | 194,9         | 310          | 232,2         | 356          | 268,8         |
| 124          | 89,4          |              |               | 217          | 159,7         | 264          | 195,7         |              |               | 357          | 269,5         |
| 125          | 90,1          | 171          | 124,7         | 218          | 160,4         | 265          | 196,4         | 311          | 232,9         | 358          | 270,4         |
| 126          | 90,9          | 172          | 125,5         | 219          | 161,2         | 266          | 197,2         | 312          | 233,7         | 359          | 271,2         |
| 127          | 91,6          | 173          | 126,2         | 220          | 161,9         | 267          | 198,0         | 313          | 234,5         | 360          | 272,2         |
| 128          | 92,4          | 174          | 127,0         |              |               | 268          | 198,8         | 314          | 235,3         |              |               |
| 129          | 93,1          | 175          | 127,8         | 221          | 162,7         | 269          | 199,5         | 315          | 236,1         | 361          | 272,9         |
| 130          | 93,8          | 176          | 128,5         | 222          | 163,4         | 270          | 200,3         | 316          | 236,8         | 362          | 273,7         |
|              |               | 177          | 129,3         | 223          | 164,2         |              |               | 317          | 237,6         | 363          | 274,5         |
| 131          | 94,6          | 178          | 130,1         | 224          | 164,9         | 271          | 201,1         | 318          | 238,4         | 364          | 275,3         |
| 132          | 95,3          | 179          | 130,8         | 225          | 165,7         | 272          | 201,9         | 319          | 239,2         | 365          | 276,2         |
| 133          | 96,1          | 180          | 131,6         | 226          | 166,4         | 273          | 202,7         | 320          | 240,0         | 366          | 277,1         |
| 134          | 96,9          |              |               | 227          | 167,2         | 274          | 203,5         |              |               | 367          | 277,9         |
| 135          | 97,6          | 181          | 132,4         | 228          | 167,9         | 275          | 204,3         | 321          | 240,7         | 368          | 278,8         |
| 136          | 98,3          | 182          | 133,1         | 229          | 168,6         | 276          | 205,1         | 322          | 241,5         | 369          | 279,6         |
| 137          | 99,1          | 183          | 133,9         | 230          | 169,4         | 277          | 205,9         | 323          | 242,3         | 370          | 280,5         |
| 138          | 99,8          | 184          | 134,7         |              |               | 278          | 206,7         | 324          | 243,1         |              |               |
| 139          | 100,5         | 185          | 135,4         | 231          | 170,1         | 279          | 207,5         | 325          | 243,9         | 371          | 281,4         |
| 140          | 101,3         | 186          | 136,2         | 232          | 170,7         | 280          | 208,3         | 326          | 244,6         | 372          | 282,2         |
|              |               | 187          | 138,0         | 233          | 171,6         |              |               | 327          | 245,4         | 373          | 283,1         |
| 141          | 102,0         | 188          | 137,8         | 234          | 172,4         | 281          | 209,1         | 328          | 246,2         | 374          | 283,9         |
| 142          | 102,8         | 189          | 138,5         | 235          | 173,1         | 282          | 209,9         | 329          | 247,0         | 375          | 284,8         |
| 143          | 103,5         | 190          | 139,3         | 236          | 173,9         | 283          | 210,7         | 330          | 247,7         | 376          | 285,7         |
| 144          | 104,3         |              |               | 237          | 174,6         | 284          | 211,5         |              |               | 377          | 286,5         |
| 145          | 105,1         | 191          | 140,0         | 238          | 175,4         | 285          | 212,3         | 331          | 248,5         | 378          | 287,4         |
| 146          | 105,8         | 192          | 140,8         | 239          | 176,2         | 286          | 213,1         | 332          | 249,2         | 379          | 288,2         |
| 147          | 106,6         | 193          | 141,6         | 240          | 176,9         | 287          | 213,9         | 333          | 250,0         | 380          | 289,1         |
| 148          | 107,3         | 194          | 142,3         |              |               | 288          | 214,7         | 334          | 250,8         |              |               |
| 149          | 108,1         | 195          | 143,1         | 241          | 177,7         | 289          | 215,5         | 335          | 251,6         | 381          | 289,9         |
| 150          | 108,8         | 196          | 143,9         | 242          | 178,5         | 290          | 216,3         | 336          | 252,5         | 382          | 290,8         |
|              |               | 197          | 144,6         | 243          | 179,3         |              |               | 337          | 253,3         | 383          | 291,7         |
| 151          | 109,6         | 198          | 145,4         | 244          | 180,1         | 291          | 217,1         | 338          | 254,1         | 384          | 292,5         |
| 152          | 110,3         | 199          | 146,2         | 245          | 180,8         | 292          | 218,9         | 339          | 254,9         | 385          | 293,4         |
| 153          | 111,1         | 200          | 146,9         | 246          | 181,6         | 293          | 218,7         | 340          | 255,7         | 386          | 294,2         |
| 154          | 111,9         |              |               | 247          | 182,4         | 294          | 219,5         |              |               | 387          | 295,1         |
| 155          | 112,6         | 201          | 147,7         | 248          | 183,2         | 295          | 220,3         | 341          | 256,5         | 388          | 296,0         |
| 156          | 113,4         | 202          | 148,5         | 249          | 184,0         | 296          | 221,1         | 342          | 257,4         | 389          | 296,8         |
| 157          | 114,1         | 203          | 149,2         | 250          | 184,8         | 297          | 221,9         | 343          | 258,2         | 390          | 297,7         |
| 158          | 114,9         | 204          | 150,0         |              |               | 298          | 222,7         | 344          | 259,0         |              |               |
| 159          | 115,6         | 205          | 150,7         | 251          | 185,5         | 299          | 223,5         | 345          | 259,8         | 391          | 298,5         |
| 160          | 116,4         | 206          | 151,5         | 252          | 186,3         | 300          | 224,4         | 346          | 260,6         | 392          | 299,4         |
|              |               | 207          | 152,2         | 253          | 187,1         |              |               | 347          | 261,4         | 393          | 300,3         |
| 161          | 117,1         | 208          | 153,0         | 254          | 187,9         | 301          | 225,2         | 348          | 262,3         | 394          | 301,1         |
| 162          | 117,9         | 209          | 153,7         | 255          | 188,7         | 302          | 225,9         | 349          | 263,1         | 395          | 302,0         |
| 163          | 118,6         | 210          | 154,5         | 256          | 189,4         | 303          | 226,7         | 350          | 263,9         | 396          | 302,8         |
| 164          | 119,4         |              |               | 257          | 190,2         | 304          | 227,5         |              |               | 397          | 303,7         |
| 165          | 120,2         | 211          | 155,2         | 258          | 191,0         | 305          | 228,3         | 351          | 264,7         | 398          | 304,6         |
| 166          | 120,9         | 212          | 156,0         | 259          | 191,8         | 306          | 229,1         | 352          | 265,5         | 399          | 305,4         |
| 167          | 121,7         | 213          | 156,7         | 260          | 192,5         | 307          | 229,8         | 353          | 266,3         | 400          | 306,3         |

Tabelle VII. Bestimmung des **Invertzuckers** (Rhodan-Jodkalium-Verfahren) nach BRUHNS (vgl. S. 869).

Tafel für 20 ccm FEHLINGSche Lösung + 20 ccm Zuckerlösung. Zusatz von Talkpulver als Siedekörper. Kochdauer 2 Minuten. 50 ccm lufthaltiges Kühlwasser. Abkühlen auf 15° oder tiefer. Messung mit 0,1387 N.-Thiosulfatlösung.

| Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invert-<br>zucker<br>allein<br>mg I | Invertzucker (I) in Gegenwart von Saccharose (S) <sup>1</sup> |               |       |      |       |       |       |       |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---|---------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
|                                   |                                     | 0,5 g S<br>mg I   | 1 g S<br>mg I | 2 g S |      | 4 g S |       | 8 g S |       |
|                                   |                                     |   |               | mg I  | % I  | mg I  | % I   | mg I  | % I   |
| 0,1                               | 0,6                                 |   |               |       |      |       |       |       |       |
| 0,2                               | 1,2                                 |   |               |       |      |       |       |       |       |
| 0,3                               | 1,7                                 | 0,1   |               |       |      |       |       |       |       |
| 0,4                               | 2,2                                 | 0,5   |               |       |      |       |       |       |       |
| 0,5                               | 2,7                                 | 0,9   |               |       |      |       |       |       |       |
| 0,6                               | 3,2                                 | 1,4   | 0,2           |       |      |       |       |       |       |
| 0,7                               | 3,7                                 | 1,8   | 0,7           |       |      |       |       |       |       |
| 0,8                               | 4,1                                 | 2,2   | 1,1           |       |      |       |       |       |       |
| 0,9                               | 4,6                                 | 2,7   | 1,6           |       |      |       |       |       |       |
| 1,0                               | 5,1                                 | 3,2   | 2,1           |       |      |       |       |       |       |
| 1,1                               | 5,5                                 | 3,6   | 2,5           | 0,5   | 0,03 |       |       |       |       |
| 1,2                               | 6,0                                 | 4,1   | 2,9           | 1,0   | 0,05 |       |       |       |       |
| 1,3                               | 6,5                                 | 4,5   | 3,3           | 1,5   | 0,08 |       |       |       |       |
| 1,4                               | 7,0                                 | 5,0   | 3,7           | 1,9   | 0,10 | 0,5   | 0,012 | 0,5   | 0,006 |
| 1,5                               | 7,4                                 | 5,5   | 4,1           | 2,3   | 0,12 | 1,0   | 0,024 | 1,0   | 0,012 |
| 1,6                               | 7,9                                 | 6,0   | 4,5           | 2,7   | 0,14 | 1,5   | 0,037 | 1,4   | 0,017 |
| 1,7                               | 8,3                                 | 6,4   | 4,9           | 3,1   | 0,16 | 2,0   | 0,051 | 1,8   | 0,023 |
| 1,8                               | 8,8                                 | 6,9   | 5,4           | 3,6   | 0,18 | 2,5   | 0,065 | 2,3   | 0,029 |
| 1,9                               | 9,3                                 | 7,4   | 5,8           | 4,0   | 0,20 | 3,0   | 0,074 | 2,7   | 0,034 |
| 2,0                               | 9,7                                 | 7,9   | 6,2           | 4,4   | 0,22 | 3,4   | 0,084 | 3,0   | 0,038 |
| 2,1                               | 10,2                                | 8,4   | 6,7           | 4,8   | 0,24 | 3,8   | 0,094 | 3,4   | 0,043 |
| 2,2                               | 10,7                                | 8,8   | 7,1           | 5,3   | 0,26 | 4,2   | 0,104 | 3,8   | 0,048 |
| 2,3                               | 11,2                                | 9,3   | 7,6           | 5,8   | 0,29 | 4,6   | 0,114 | 4,2   | 0,053 |
| 2,4                               | 11,6                                | 9,8   | 8,0           | 6,2   | 0,31 | 5,0   | 0,124 | 4,6   | 0,058 |
| 2,5                               | 12,1                                | 10,3  | 8,5           | 6,7   | 0,34 | 5,4   | 0,135 | 5,0   | 0,063 |
| 2,6                               | 12,6                                | 10,7  | 8,9           | 7,2   | 0,36 | 5,9   | 0,147 | 5,4   | 0,068 |
| 2,7                               | 13,0                                | 11,2  | 9,3           | 7,6   | 0,38 | 6,4   | 0,159 | 5,8   | 0,073 |
| 2,8                               | 13,5                                | 11,7  | 9,8           | 8,1   | 0,41 | 6,8   | 0,170 | 6,2   | 0,078 |
| 2,9                               | 14,0                                | 12,1  | 10,2          | 8,6   | 0,43 | 7,3   | 0,182 | 6,6   | 0,083 |
| 3,0                               | 14,5                                | 12,6  | 10,7          | 9,1   | 0,45 | 7,7   | 0,193 | 7,0   | 0,088 |
| 3,1                               | 14,9                                | 13,1  | 11,2          | 9,5   | 0,48 | 8,2   | 0,205 | 7,4   | 0,093 |
| 3,2                               | 15,4                                | 13,5  | 11,7          | 10,0  | 0,50 | 8,7   | 0,217 | 7,8   | 0,098 |
| 3,3                               | 15,9                                | 14,0  | 12,2          | 10,5  | 0,52 | 9,1   | 0,228 | 8,2   | 0,103 |
| 3,4                               | 16,3                                | 14,5  | 12,7          | 10,9  | 0,55 | 9,6   | 0,24  | 8,6   | 0,108 |
| 3,5                               | 16,8                                | 14,9  | 13,1          | 11,4  | 0,57 | 10,0  | 0,25  | 9,0   | 0,113 |
| 3,6                               | 17,3                                | 15,4  | 13,6          | 11,9  | 0,59 | 10,5  | 0,26  | 9,4   | 0,118 |
| 3,7                               | 17,7                                | 15,9  | 14,1          | 12,4  | 0,62 | 11,0  | 0,27  | 9,8   | 0,123 |
| 3,8                               | 18,2                                | 16,3  | 14,6          | 12,8  | 0,64 | 11,4  | 0,29  | 10,2  | 0,128 |
| 3,9                               | 18,7                                | 16,8  | 15,1          | 13,3  | 0,67 | 11,9  | 0,30  | 10,6  | 0,133 |
| 4,0                               | 19,2                                | 17,2  | 15,6          | 13,8  | 0,69 | 12,3  | 0,31  | 11,1  | 0,139 |
| 4,1                               | 19,6                                | 17,7  | 16,0          | 14,2  | 0,71 | 12,8  | 0,32  | 11,5  | 0,144 |
| 4,2                               | 20,1                                | 18,2  | 16,5          | 14,7  | 0,74 | 13,2  | 0,33  | 11,9  | 0,149 |
| 4,3                               | 20,5                                | 18,6  | 17,0          | 15,2  | 0,76 | 13,6  | 0,34  | 12,4  | 0,155 |
| 4,4                               | 21,0                                | 19,1  | 17,5          | 15,6  | 0,78 | 14,1  | 0,35  | 12,8  | 0,160 |
| 4,5                               | 21,5                                | 19,6  | 18,0          | 16,1  | 0,81 | 14,6  | 0,36  | 13,3  | 0,166 |
| 4,6                               | 22,0                                | 20,0  | 18,4          | 16,6  | 0,83 | 15,0  | 0,38  | 13,7  | 0,171 |
| 4,7                               | 22,4                                | 20,5  | 18,9          | 17,1  | 0,85 | 15,5  | 0,39  | 14,1  | 0,176 |

<sup>1</sup> Die Prozentwerte sind auf die Saccharose bezogen.

Tabelle VII. Bestimmung des Invertzuckers nach BRUHNS.

1695

| Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invert-<br>zucker<br>allein<br>mg I | Invertzucker (I) in Gegenwart von Saccharose (S) |               |       |      |       |      |       |       |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|---------------|-------|------|-------|------|-------|-------|
|                                   |                                     | 0,5 g S<br>mg I                                  | 1 g S<br>mg I | 2 g S |      | 4 g S |      | 8 g S |       |
|                                   |                                     |  |               | mg I  | % I  | mg I  | % I  | mg I  | % I   |
| 4,8                               | 22,9                                | 21,0   | 19,4          | 17,5  | 0,88 | 15,8  | 0,40 | 14,6  | 0,182 |
| 4,9                               | 23,4                                | 21,4   | 19,9          | 18,0  | 0,90 | 16,4  | 0,41 | 15,0  | 0,187 |
| 5,0                               | 23,8                                | 21,9   | 20,4          | 18,5  | 0,92 | 16,8  | 0,42 | 15,4  | 0,193 |
| 5,1                               | 24,3                                | 22,4   | 20,9          | 18,9  | 0,95 | 17,3  | 0,43 | 15,8  | 0,198 |
| 5,2                               | 24,8                                | 22,8   | 21,3          | 19,4  | 0,97 | 17,8  | 0,44 | 16,2  | 0,20  |
| 5,3                               | 25,2                                | 23,3   | 21,8          | 19,9  | 0,99 | 18,2  | 0,46 | 16,7  | 0,21  |
| 5,4                               | 25,7                                | 23,7   | 22,3          | 20,3  | 1,02 | 18,7  | 0,47 | 17,1  | 0,21  |
| 5,5                               | 26,2                                | 24,2   | 22,8          | 20,8  | 1,04 | 19,1  | 0,48 | 17,6  | 0,22  |
| 5,6                               | 26,7                                | 24,7   | 23,2          | 21,3  | 1,1  | 19,6  | 0,49 | 18,0  | 0,23  |
| 5,7                               | 27,1                                | 25,1   | 23,7          | 21,8  | 1,1  | 20,0  | 0,50 | 18,4  | 0,23  |
| 5,8                               | 27,6                                | 25,6   | 24,2          | 22,2  | 1,15 | 20,5  | 0,51 | 18,9  | 0,24  |
| 5,9                               | 28,1                                | 26,1   | 24,7          | 22,7  | 1,15 | 21,0  | 0,52 | 19,3  | 0,24  |
| 6,0                               | 28,5                                | 26,5   | 25,2          | 23,2  | 1,2  | 21,4  | 0,54 | 19,8  | 0,25  |
| 6,1                               | 29,0                                | 27,0   | 25,6          | 23,6  | 1,2  | 21,8  | 0,55 | 20,2  | 0,25  |
| 6,2                               | 29,5                                | 27,4   | 26,1          | 24,1  | 1,25 | 22,3  | 0,56 | 20,6  | 0,26  |
| 6,3                               | 30,0                                | 27,9   | 26,6          | 24,6  | 1,25 | 22,8  | 0,57 | 21,0  | 0,26  |
| 6,4                               | 30,4                                | 28,3   | 27,0          | 25,1  | 1,3  | 23,2  | 0,58 | 21,4  | 0,27  |
| 6,5                               | 30,9                                | 28,8   | 27,5          | 26,5  | 1,3  | 23,7  | 0,59 | 21,9  | 0,27  |
| 6,6                               | 31,4                                | 29,3   | 27,9          | 26,0  | 1,35 | 24,1  | 0,60 | 22,3  | 0,28  |
| 6,7                               | 31,9                                | 29,7   | 28,4          | 26,5  | 1,35 | 24,6  | 0,62 | 22,7  | 0,28  |
| 6,8                               | 32,4                                | 30,2   | 28,8          | 27,0  | 1,4  | 25,0  | 0,63 | 23,2  | 0,29  |
| 6,9                               | 32,9                                | 30,7   | 29,3          | 27,5  | 1,4  | 25,6  | 0,64 | 23,6  | 0,30  |
| 7,0                               | 33,4                                | 31,2   | 29,7          | 28,0  | 1,4  | 26,1  | 0,65 | 24,1  | 0,30  |
| 7,1                               | 33,9                                | 31,7   | 30,2          | 28,4  | 1,45 | 26,6  | 0,67 | 24,5  | 0,31  |
| 7,2                               | 34,4                                | 32,2   | 30,7          | 28,9  | 1,45 | 27,1  | 0,68 | 24,9  | 0,31  |
| 7,3                               | 34,8                                | 32,7   | 31,2          | 29,4  | 1,5  | 27,6  | 0,69 | 25,4  | 0,32  |
| 7,4                               | 35,3                                | 33,2   | 31,7          | 29,9  | 1,5  | 28,1  | 0,70 | 25,8  | 0,32  |
| 7,5                               | 35,8                                | 33,7   | 32,2          | 30,4  | 1,55 | 28,6  | 0,72 | 26,3  | 0,33  |
| 7,6                               | 36,3                                | 34,2   | 32,7          | 30,9  | 1,55 | 29,1  | 0,73 | 26,8  | 0,34  |
| 7,7                               | 36,8                                | 34,7   | 33,2          | 31,4  | 1,6  | 29,6  | 0,74 | 27,3  | 0,34  |
| 7,8                               | 37,3                                | 35,2   | 33,7          | 31,9  | 1,6  | 30,2  | 0,75 | 27,8  | 0,35  |
| 7,9                               | 37,8                                | 35,7   | 34,2          | 32,4  | 1,65 | 30,6  | 0,77 | 28,2  | 0,35  |
| 8,0                               | 38,3                                | 36,2   | 34,7          | 32,9  | 1,65 | 31,1  | 0,78 | 28,7  | 0,36  |
| 8,1                               | 38,8                                | 36,7   | 35,2          | 33,4  | 1,7  | 31,6  | 0,79 | 29,2  | 0,37  |
| 8,2                               | 39,2                                | 37,2   | 35,7          | 33,9  | 1,7  | 32,1  | 0,80 | 29,7  | 0,37  |
| 8,3                               | 39,7                                | 37,6   | 36,2          | 34,4  | 1,75 | 32,6  | 0,81 | 30,2  | 0,38  |
| 8,4                               | 40,2                                | 38,1   | 36,7          | 34,9  | 1,75 | 33,0  | 0,83 | 30,6  | 0,38  |
| 8,5                               | 40,7                                | 38,6   | 37,2          | 35,4  | 1,8  | 33,6  | 0,84 | 31,1  | 0,39  |
| 8,6                               | 41,2                                | 39,1   | 37,7          | 35,9  | 1,8  | 34,0  | 0,85 | 31,6  | 0,40  |
| 8,8                               | 42,2                                | 40,1   | 38,2          | 36,4  | 1,85 | 34,5  | 0,86 | 32,1  | 0,40  |
| 8,8                               | 42,2                                | 40,1   | 38,7          | 36,9  | 1,85 | 35,0  | 0,88 | 32,6  | 0,41  |
| 8,9                               | 42,7                                | 40,6   | 39,2          | 37,4  | 1,9  | 35,5  | 0,89 | 33,0  | 0,41  |
| 9,0                               | 43,2                                | 41,1   | 39,7          | 37,9  | 1,9  | 36,0  | 0,90 | 33,5  | 0,42  |
| 9,1                               | 43,6                                | 41,6   | 40,2          | 38,4  | 1,95 | 36,4  | 0,91 | 34,0  | 0,43  |
| 9,2                               | 44,1                                | 42,1   | 40,7          | 38,9  | 1,95 | 37,0  | 0,92 | 34,4  | 0,43  |
| 9,3                               | 44,6                                | 42,6   | 41,1          | 39,4  | 2,0  | 37,4  | 0,94 | 34,9  | 0,44  |
| 9,4                               | 45,1                                | 43,1   | 41,6          | 39,9  | 2,0  | 37,9  | 0,95 | 35,4  | 0,44  |
| 9,5                               | 45,6                                | 43,6   | 42,1          | 40,4  | 2,05 | 38,4  | 0,96 | 35,8  | 0,45  |
| 9,6                               | 46,1                                | 44,1   | 42,6          | 40,9  | 2,05 | 38,9  | 0,97 | 36,3  | 0,45  |
| 9,7                               | 46,6                                | 44,6   | 43,1          | 41,3  | 2,1  | 39,4  | 0,98 | 36,8  | 0,46  |
| 9,8                               | 47,1                                | 45,1   | 43,6          | 41,8  | 2,1  | 39,8  | 1,00 | 37,3  | 0,47  |
| 9,9                               | 47,6                                | 45,6   | 44,1          | 42,3  | 2,15 | 40,3  | 1,01 | 37,8  | 0,47  |
| 10,0                              | 48,0                                | 46,1   | 44,6          | 42,8  | 2,15 | 40,8  | 1,02 | 38,2  | 0,48  |
| 10,1                              | 48,5                                | 46,6   | 45,1          | 43,3  | 2,2  | 41,3  | 1,03 | 38,7  | 0,48  |
| 10,2                              | 49,0                                | 47,1   | 45,6          | 43,8  | 2,2  | 41,8  | 1,05 | 39,1  | 0,49  |



| Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invert<br>zucker<br>allein<br>mg I | Invertzucker (I) in Gegenwart von Saccharose (S) |               |       |      |       |      |       |      |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|---------------|-------|------|-------|------|-------|------|
|                                   |                                    | 0,5 g S<br>mg I                                  | 1 g S<br>mg I | 2 g S |      | 4 g S |      | 8 g S |      |
|                                   |                                    |  |               | mg I  | % I  | mg I  | % I  | mg I  | % I  |
| 10,3                              | 49,5                               | 47,6   | 46,1          | 44,3  | 2,25 | 42,3  | 1,06 | 39,6  | 0,50 |
| 10,4                              | 50,0                               | 48,1   | 46,6          | 44,8  | 2,25 | 42,8  | 1,07 | 40,1  | 0,50 |
| 10,5                              | 50,5                               | 48,6   | 47,1          | 45,3  | 2,3  | 43,2  | 1,08 | 40,6  | 0,51 |
| 10,6                              | 51,0                               | 49,1   | 47,6          | 45,8  | 2,3  | 43,7  | 1,09 | 41,0  | 0,51 |
| 10,7                              | 51,5                               | 49,6   | 48,1          | 46,3  | 2,35 | 44,2  | 1,11 | 41,5  | 0,52 |
| 10,8                              | 52,0                               | 50,1   | 48,6          | 46,8  | 2,35 | 44,7  | 1,12 | 42,0  | 0,53 |
| 10,9                              | 52,5                               | 50,6   | 49,1          | 47,3  | 2,4  | 45,2  | 1,13 | 42,5  | 0,53 |
| 11,0                              | 53,1                               | 51,1   | 49,6          | 47,8  | 2,4  | 45,7  | 1,14 | 43,0  | 0,54 |
| 11,1                              | 53,6                               | 51,6   | 50,1          | 48,3  | 2,45 | 46,3  | 1,15 | 43,4  | 0,54 |
| 11,2                              | 54,1                               | 52,1   | 50,6          | 48,8  | 2,45 | 46,6  | 1,17 | 43,8  | 0,55 |
| 11,3                              | 54,6                               | 52,6   | 51,2          | 49,3  | 2,5  | 47,1  | 1,18 | 44,3  | 0,55 |
| 11,4                              | 55,1                               | 53,2   | 51,7          | 49,8  | 2,5  | 47,6  | 1,19 | 44,8  | 0,56 |
| 11,5                              | 55,6                               | 53,7   | 52,2          | 50,3  | 2,55 | 48,1  | 1,20 | 45,3  | 0,57 |
| 11,6                              | 56,1                               | 54,2   | 52,7          | 50,8  | 2,55 | 48,6  | 1,2  | 45,8  | 0,57 |
| 11,7                              | 56,6                               | 54,7   | 53,3          | 51,4  | 2,6  | 49,1  | 1,2  | 46,2  | 0,58 |
| 11,8                              | 57,1                               | 55,2   | 53,8          | 51,9  | 2,6  | 49,5  | 1,2  | 46,7  | 0,58 |
| 11,9                              | 57,6                               | 55,8   | 54,3          | 52,4  | 2,65 | 50,0  | 1,3  | 47,2  | 0,59 |
| 12,0                              | 58,1                               | 56,3   | 54,8          | 52,9  | 2,65 | 50,6  | 1,3  | 47,7  | 0,60 |
| 12,1                              | 58,6                               | 56,8   | 55,4          | 53,5  | 2,7  | 51,1  | 1,3  | 48,2  | 0,60 |
| 12,2                              | 59,2                               | 57,3   | 55,9          | 54,0  | 2,7  | 51,6  | 1,3  | 48,6  | 0,61 |
| 12,3                              | 59,7                               | 57,8   | 56,4          | 54,5  | 2,75 | 52,1  | 1,35 | 49,0  | 0,61 |
| 12,4                              | 60,2                               | 58,3   | 56,9          | 55,0  | 2,8  | 52,6  | 1,35 | 49,5  | 0,62 |
| 12,5                              | 60,7                               | 58,9   | 57,5          | 55,6  | 2,8  | 53,2  | 1,35 | 50,0  | 0,63 |
| 12,6                              | 61,2                               | 59,4   | 58,0          | 56,1  | 2,85 | 53,6  | 1,35 | 50,5  | 0,63 |
| 12,7                              | 61,7                               | 59,9   | 58,5          | 56,6  | 2,85 | 54,2  | 1,4  | 51,0  | 0,64 |
| 12,8                              | 62,2                               | 60,4   | 59,0          | 57,1  | 2,9  | 54,7  | 1,4  | 51,4  | 0,64 |
| 12,9                              | 62,7                               | 60,9   | 59,6          | 57,7  | 2,9  | 55,2  | 1,4  | 51,9  | 0,65 |
| 13,0                              | 63,2                               | 61,4   | 60,1          | 58,2  | 2,95 | 55,7  | 1,4  | 52,5  | 0,66 |
| 13,1                              | 63,7                               | 62,0   | 60,6          | 58,7  | 2,95 | 56,2  | 1,45 | 53,0  | 0,66 |
| 13,2                              | 64,2                               | 62,5   | 61,1          | 59,2  | 3,0  | 56,8  | 1,45 | 53,4  | 0,67 |
| 13,3                              | 64,7                               | 63,0   | 61,7          | 59,7  | 3,0  | 57,3  | 1,45 | 53,9  | 0,67 |
| 13,4                              | 65,2                               | 63,5   | 62,2          | 60,3  | 3,05 | 57,8  | 1,45 | 54,4  | 0,68 |
| 13,5                              | 65,8                               | 64,0   | 62,7          | 60,8  | 3,05 | 58,3  | 1,5  | 54,9  | 0,69 |
| 13,6                              | 66,3                               | 64,5   | 63,2          | 61,3  | 3,1  | 58,8  | 1,5  | 55,4  | 0,69 |
| 13,7                              | 66,8                               | 65,1   | 63,8          | 61,8  | 3,1  | 59,3  | 1,5  | 55,8  | 0,70 |
| 13,8                              | 67,3                               | 65,6   | 64,3          | 62,4  | 3,15 | 59,8  | 1,5  | 56,4  | 0,71 |
| 13,9                              | 67,8                               | 66,1   | 64,8          | 62,9  | 3,15 | 60,4  | 1,55 | 56,9  | 0,71 |
| 14,0                              | 68,3                               | 66,6   | 65,3          | 63,4  | 3,2  | 60,8  | 1,55 | 57,4  | 0,72 |
| 14,1                              | 68,8                               | 67,1   | 65,9          | 63,9  | 3,2  | 61,4  | 1,55 | 57,8  | 0,72 |
| 14,2                              | 69,3                               | 67,7   | 66,4          | 64,5  | 3,25 | 61,9  | 1,55 | 58,3  | 0,73 |
| 14,3                              | 69,8                               | 68,2   | 66,9          | 65,0  | 3,3  | 62,4  | 1,6  | 58,8  | 0,74 |
| 14,4                              | 70,3                               | 68,7   | 67,4          | 65,5  | 3,3  | 63,0  | 1,6  | 59,3  | 0,74 |
| 14,5                              | 70,8                               | 69,2   | 68,0          | 66,0  | 3,35 | 63,4  | 1,6  | 59,8  | 0,75 |
| 14,6                              | 71,3                               | 69,7   | 68,5          | 66,6  | 3,35 | 64,0  | 1,6  | 60,3  | 0,75 |
| 14,7                              | 71,8                               | 70,2   | 69,0          | 67,1  | 3,4  | 64,5  | 1,65 | 60,8  | 0,76 |
| 14,8                              | 72,4                               | 70,8   | 69,5          | 67,6  | 3,4  | 65,0  | 1,65 | 61,3  | 0,77 |
| 14,9                              | 72,9                               | 71,3   | 70,1          | 68,1  | 3,45 | 65,5  | 1,65 | 61,8  | 0,77 |
| 15,0                              | 73,4                               | 71,8   | 70,6          | 68,7  | 3,45 | 66,0  | 1,7  | 62,2  | 0,78 |
| 15,1                              | 73,9                               | 72,3   | 71,1          | 69,2  | 3,5  | 66,5  | 1,7  | 62,7  | 0,78 |
| 15,2                              | 74,4                               | 72,8   | 71,6          | 69,7  | 3,5  | 67,0  | 1,7  | 63,2  | 0,79 |
| 15,3                              | 74,9                               | 73,3   | 72,2          | 70,2  | 3,55 | 67,6  | 1,7  | 63,7  | 0,80 |
| 15,4                              | 75,4                               | 73,9   | 72,7          | 70,8  | 3,55 | 68,1  | 1,75 | 64,2  | 0,80 |
| 15,5                              | 76,0                               | 74,4   | 73,2          | 71,3  | 3,6  | 68,6  | 1,75 | 64,7  | 0,81 |
| 15,6                              | 76,5                               | 74,9   | 73,7          | 71,8  | 3,6  | 69,1  | 1,75 | 65,2  | 0,82 |

Tabelle VIIIA. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15}_{15}$ . 1697

| Thio-<br>sulfat-<br>lösung<br>ccm | Invert-<br>zucker<br>allein<br>mg I | Invertzucker (I) in Gegenwart von Saccharose (S) |      |       |      |       |      |       |      |       |  |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|--|
|                                   |                                     | 0,5 g S  |      | 1 g S |      | 2 g S |      | 4 g S |      | 8 g S |  |
|                                   |                                     | mg I   | mg I | mg I  | % I  | mg I  | % I  | mg I  | % I  |       |  |
| 15,7                              | 77,1                                | 75,4   | 74,3 | 72,3  | 3,65 | 69,6  | 1,75 | 85,7  | 0,82 |       |  |
| 15,8                              | 77,6                                | 76,0   | 74,8 | 72,9  | 3,65 | 70,2  | 1,8  | 66,2  | 0,83 |       |  |
| 15,9                              | 78,2                                | 76,5   |      | 73,4  | 3,7  | 70,7  | 1,8  | 66,6  | 0,83 |       |  |
| 16,0                              | 78,7                                | 77,1   |      | 73,9  | 3,7  | 71,2  | 1,8  | 67,1  | 0,84 |       |  |
| 16,1                              | 79,3                                | 77,7   |      | 74,4  | 3,75 | 71,7  | 1,8  | 67,6  | 0,85 |       |  |
| 16,2                              | 79,8                                | 78,2   |      | 74,9  | 3,75 | 72,2  | 1,85 | 68,1  | 0,85 |       |  |
| 16,3                              | 80,3                                | 78,8   |      |       |      | 72,7  | 1,85 | 68,6  | 0,86 |       |  |
| 16,4                              | 80,9                                | 79,3   |      |       |      | 73,2  | 1,85 | 69,1  | 0,86 |       |  |
| 16,5                              | 81,4                                | 79,9   |      |       |      | 73,8  | 1,85 | 69,6  | 0,87 |       |  |
| 16,6                              | 82,0                                | 80,4   |      |       |      | 74,3  | 1,9  | 70,1  | 0,88 |       |  |
| 16,7                              | 82,5                                | 81,0   |      |       |      | 74,8  | 1,9  | 70,6  | 0,88 |       |  |
| 16,8                              | 83,1                                | 81,5   |      |       |      |       |      | 71,0  | 0,89 |       |  |
| 16,9                              | 83,6                                | 82,1   |      |       |      |       |      | 71,5  | 0,89 |       |  |
| 17,0                              | 84,2                                | 83,6   |      |       |      |       |      | 72,0  | 0,90 |       |  |
| 17,1                              | 84,7                                | 83,2   |      |       |      |       |      | 72,6  | 0,91 |       |  |
| 17,2                              | 85,3                                | 83,7   |      |       |      |       |      | 73,0  | 0,91 |       |  |
| 17,3                              | 85,8                                | 84,3   |      |       |      |       |      | 73,5  | 0,92 |       |  |
| 17,4                              | 86,4                                | 84,8   |      |       |      |       |      | 74,0  | 0,93 |       |  |
| 17,5                              | 86,9                                |  |      |       |      |       |      | 74,5  | 0,93 |       |  |
| 17,6                              | 87,4                                |  |      |       |      |       |      | 75,0  | 0,94 |       |  |
| 17,7                              | 88,0                                |  |      |       |      |       |      |       |      |       |  |
| 17,8                              | 88,5                                |  |      |       |      |       |      |       |      |       |  |
| 17,9                              | 89,1                                |  |      |       |      |       |      |       |      |       |  |
| 18,0                              | 89,6                                |  |      |       |      |       |      |       |      |       |  |

Tabelle VIIIA. Bestimmung des Alkoholgehaltes von Alkohol-Wasser-  
mischungen aus der scheinbaren Dichte bei 15° nach K. WINDISCH  
(vgl. S. 1009).

| Schein-<br>bare<br>Dichte<br>$d^{15}_{15}$ | Alkohol     |             |                 | Schein-<br>bare<br>Dichte<br>$d^{15}_{15}$ | Alkohol     |             |                 | Schein-<br>bare<br>Dichte<br>$d^{15}_{15}$ | Alkohol     |             |                 |
|--|-------------|-------------|-----------------|--|-------------|-------------|-----------------|--|-------------|-------------|-----------------|
|  | Gew.-<br>%  | Raum-<br>%  | g in<br>100 ccm |  | Gew.-<br>%  | Raum-<br>%  | g in<br>100 ccm |  | Gew.-<br>%  | Raum-<br>%  | g in<br>100 ccm |
| <b>1,0000</b>                              | <b>0,00</b> | <b>0,00</b> | <b>0,00</b>     |  |             |             |                 |  |             |             |                 |
| <b>0,9999</b>                              | <b>0,05</b> | <b>0,07</b> | <b>0,05</b>     | <b>0,9979</b>                              | <b>1,12</b> | <b>1,41</b> | <b>1,12</b>     | <b>0,9959</b>                              | <b>2,22</b> | <b>2,79</b> | <b>2,21</b>     |
| 8  | 0,11        | 0,13        | 0,11            | 8  | 1,17        | 1,48        | 1,17            | 8  | 2,28        | 2,86        | 2,27            |
| 7  | 0,16        | 0,20        | 0,16            | 7  | 1,23        | 1,54        | 1,22            | 7  | 2,34        | 2,93        | 2,32            |
| 6  | 0,21        | 0,27        | 0,21            | 6  | 1,28        | 1,61        | 1,28            | 6  | 2,39        | 3,00        | 2,38            |
| 5  | 0,26        | 0,33        | 0,26            | 5  | 1,34        | 1,68        | 1,33            | 5  | 2,45        | 3,07        | 2,43            |
| 4  | 0,32        | 0,40        | 0,32            | 4  | 1,39        | 1,75        | 1,39            | 4  | 2,50        | 3,14        | 2,49            |
| 3  | 0,37        | 0,47        | 0,37            | 3  | 1,45        | 1,82        | 1,44            | 3  | 2,56        | 3,21        | 2,55            |
| 2  | 0,42        | 0,53        | 0,42            | 2  | 1,50        | 1,88        | 1,50            | 2  | 2,62        | 3,28        | 2,60            |
| 1  | 0,48        | 0,60        | 0,47            | 1  | 1,56        | 1,95        | 1,55            | 1  | 2,68        | 3,35        | 2,66            |
| 0  | 0,53        | 0,67        | 0,53            | 0  | 1,61        | 2,02        | 1,60            | 0  | 2,73        | 3,42        | 2,72            |
| <b>0,9989</b>                              | <b>0,58</b> | <b>0,73</b> | <b>0,58</b>     | <b>0,9969</b>                              | <b>1,67</b> | <b>2,09</b> | <b>1,66</b>     | <b>0,9949</b>                              | <b>2,79</b> | <b>3,49</b> | <b>2,77</b>     |
| 8  | 0,64        | 0,80        | 0,64            | 8  | 1,72        | 2,16        | 1,71            | 8  | 2,84        | 3,56        | 2,82            |
| 7  | 0,69        | 0,87        | 0,69            | 7  | 1,78        | 2,23        | 1,77            | 7  | 2,90        | 3,64        | 2,88            |
| 6  | 0,74        | 0,93        | 0,74            | 6  | 1,83        | 2,30        | 1,82            | 6  | 2,96        | 3,71        | 2,94            |
| 5  | 0,80        | 1,00        | 0,80            | 5  | 1,89        | 2,37        | 1,88            | 5  | 3,02        | 3,78        | 3,00            |
| 4  | 0,85        | 1,07        | 0,85            | 4  | 1,94        | 2,44        | 1,93            | 4  | 3,08        | 3,85        | 3,06            |
| 3  | 0,90        | 1,14        | 0,90            | 3  | 2,00        | 2,51        | 1,99            | 3  | 3,14        | 3,93        | 3,12            |
| 2  | 0,96        | 1,20        | 0,96            | 2  | 2,05        | 2,58        | 2,04            | 2  | 3,19        | 4,00        | 3,17            |
| 1  | 1,01        | 1,27        | 1,01            | 1  | 2,11        | 2,65        | 2,10            | 1  | 3,25        | 4,07        | 3,23            |
| 0  | 1,06        | 1,34        | 1,06            | 0  | 2,17        | 2,72        | 2,16            | 0  | 3,31        | 4,14        | 3,29            |

1698 Tabelle VIII. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15/15}$ .

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol     |             |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                               | Gew.-%      | Raum.-%     | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum.-%      | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum.-%      | g in 100 ccm |
| <b>0,9939</b>                 | <b>3,37</b> | <b>4,22</b> | <b>3,35</b>  | <b>0,9879</b>                 | <b>7,15</b>  | <b>8,89</b>  | <b>7,06</b>  | <b>0,9819</b>                 | <b>11,56</b> | <b>14,29</b> | <b>11,34</b> |
| 8                             | 3,43        | 4,29        | 3,40         | 8                             | 7,22         | 8,98         | 7,12         | 8                             | 11,64        | 14,39        | 11,42        |
| 7                             | 3,49        | 4,36        | 3,46         | 7                             | 7,29         | 9,06         | 7,19         | 7                             | 11,72        | 14,48        | 11,49        |
| 6                             | 3,55        | 4,43        | 3,52         | 6                             | 7,36         | 9,15         | 7,26         | 6                             | 11,80        | 14,58        | 11,57        |
| 5                             | 3,60        | 4,51        | 3,58         | 5                             | 7,42         | 9,23         | 7,33         | 5                             | 11,88        | 14,68        | 11,65        |
| 4                             | 3,66        | 4,58        | 3,64         | 4                             | 7,49         | 9,32         | 7,39         | 4                             | 11,96        | 14,77        | 11,72        |
| 3                             | 3,72        | 4,65        | 3,69         | 3                             | 7,56         | 9,40         | 7,46         | 3                             | 12,04        | 14,87        | 11,80        |
| 2                             | 3,78        | 4,73        | 3,75         | 2                             | 7,63         | 9,48         | 7,53         | 2                             | 12,12        | 14,97        | 11,88        |
| 1                             | 3,84        | 4,80        | 3,81         | 1                             | 7,70         | 9,57         | 7,60         | 1                             | 12,20        | 15,07        | 11,96        |
| 0                             | 3,90        | 4,88        | 3,87         | 0                             | 7,77         | 9,66         | 7,66         | 0                             | 12,28        | 15,16        | 12,03        |
| <b>0,9929</b>                 | <b>3,96</b> | <b>4,95</b> | <b>3,93</b>  | <b>0,9869</b>                 | <b>7,84</b>  | <b>9,74</b>  | <b>7,73</b>  | <b>0,9809</b>                 | <b>12,36</b> | <b>15,26</b> | <b>12,11</b> |
| 8                             | 4,02        | 5,03        | 3,99         | 8                             | 7,91         | 9,83         | 7,80         | 8                             | 12,44        | 15,36        | 12,19        |
| 7                             | 4,08        | 5,10        | 4,05         | 7                             | 7,98         | 9,91         | 7,87         | 7                             | 12,52        | 15,46        | 12,27        |
| 6                             | 4,14        | 5,18        | 4,11         | 6                             | 8,05         | 10,00        | 7,94         | 6                             | 12,60        | 15,55        | 12,34        |
| 5                             | 4,20        | 5,25        | 4,17         | 5                             | 8,12         | 10,09        | 8,00         | 5                             | 12,68        | 15,65        | 12,42        |
| 4                             | 4,26        | 5,33        | 4,23         | 4                             | 8,19         | 10,17        | 8,07         | 4                             | 12,76        | 15,75        | 12,50        |
| 3                             | 4,32        | 5,40        | 4,29         | 3                             | 8,26         | 10,26        | 8,14         | 3                             | 12,84        | 15,85        | 12,58        |
| 2                             | 4,39        | 5,48        | 4,35         | 2                             | 8,33         | 10,35        | 8,21         | 2                             | 12,92        | 15,95        | 12,65        |
| 1                             | 4,45        | 5,55        | 4,41         | 1                             | 8,41         | 10,43        | 8,28         | 1                             | 13,00        | 16,04        | 12,73        |
| 0                             | 4,51        | 5,63        | 4,47         | 0                             | 8,48         | 10,52        | 8,35         | 0                             | 13,08        | 16,14        | 12,81        |
| <b>0,9919</b>                 | <b>4,57</b> | <b>5,70</b> | <b>4,53</b>  | <b>0,9859</b>                 | <b>8,55</b>  | <b>10,61</b> | <b>8,42</b>  | <b>0,9799</b>                 | <b>13,16</b> | <b>16,24</b> | <b>12,89</b> |
| 8                             | 4,63        | 5,78        | 4,59         | 8                             | 8,62         | 10,70        | 8,49         | 8                             | 13,25        | 16,34        | 12,97        |
| 7                             | 4,69        | 5,86        | 4,65         | 7                             | 8,69         | 10,79        | 8,56         | 7                             | 13,33        | 16,44        | 13,05        |
| 6                             | 4,75        | 5,93        | 4,71         | 6                             | 8,76         | 10,88        | 8,63         | 6                             | 13,41        | 16,54        | 13,13        |
| 5                             | 4,81        | 6,01        | 4,77         | 5                             | 8,84         | 10,96        | 8,70         | 5                             | 13,49        | 16,64        | 13,20        |
| 4                             | 4,88        | 6,09        | 4,83         | 4                             | 8,91         | 11,05        | 8,77         | 4                             | 13,57        | 16,74        | 13,28        |
| 3                             | 4,94        | 6,16        | 4,89         | 3                             | 8,98         | 11,14        | 8,84         | 3                             | 13,66        | 16,84        | 13,36        |
| 2                             | 5,00        | 6,24        | 4,95         | 2                             | 9,06         | 11,23        | 8,91         | 2                             | 13,74        | 16,94        | 13,44        |
| 1                             | 5,06        | 6,32        | 5,01         | 1                             | 9,13         | 11,32        | 8,98         | 1                             | 13,82        | 17,04        | 13,52        |
| 0                             | 5,13        | 6,40        | 5,08         | 0                             | 9,20         | 11,41        | 9,06         | 0                             | 13,90        | 17,14        | 13,60        |
| <b>0,9909</b>                 | <b>5,19</b> | <b>6,47</b> | <b>5,14</b>  | <b>0,9849</b>                 | <b>9,28</b>  | <b>11,50</b> | <b>9,13</b>  | <b>0,9789</b>                 | <b>13,98</b> | <b>17,24</b> | <b>13,68</b> |
| 8                             | 5,25        | 6,55        | 5,20         | 8                             | 9,35         | 11,59        | 9,20         | 8                             | 14,07        | 17,34        | 13,76        |
| 7                             | 5,32        | 6,63        | 5,26         | 7                             | 9,42         | 11,68        | 9,27         | 7                             | 14,15        | 17,44        | 13,84        |
| 6                             | 5,38        | 6,71        | 5,32         | 6                             | 9,50         | 11,77        | 9,34         | 6                             | 14,23        | 17,54        | 13,92        |
| 5                             | 5,44        | 6,79        | 5,38         | 5                             | 9,57         | 11,86        | 9,42         | 5                             | 14,32        | 17,64        | 14,00        |
| 4                             | 5,51        | 6,86        | 5,45         | 4                             | 9,65         | 11,95        | 9,49         | 4                             | 14,40        | 17,74        | 14,08        |
| 3                             | 5,57        | 6,94        | 5,51         | 3                             | 9,72         | 12,05        | 9,56         | 3                             | 14,48        | 17,84        | 14,15        |
| 2                             | 5,63        | 7,02        | 5,57         | 2                             | 9,80         | 12,14        | 9,63         | 2                             | 14,56        | 17,94        | 14,23        |
| 1                             | 5,70        | 7,10        | 5,64         | 1                             | 9,87         | 12,23        | 9,70         | 1                             | 14,65        | 18,04        | 14,31        |
| 0                             | 5,76        | 7,18        | 5,70         | 0                             | 9,94         | 12,32        | 9,78         | 0                             | 14,73        | 18,14        | 14,39        |
| <b>0,9899</b>                 | <b>5,83</b> | <b>7,26</b> | <b>5,76</b>  | <b>0,9839</b>                 | <b>10,02</b> | <b>12,41</b> | <b>9,85</b>  | <b>0,9779</b>                 | <b>14,81</b> | <b>18,24</b> | <b>14,47</b> |
| 8                             | 5,89        | 7,34        | 5,83         | 8                             | 10,10        | 12,50        | 9,92         | 8                             | 14,90        | 18,34        | 14,55        |
| 7                             | 5,96        | 7,42        | 5,89         | 7                             | 10,17        | 12,59        | 9,99         | 7                             | 14,98        | 18,44        | 14,63        |
| 6                             | 6,02        | 7,50        | 5,95         | 6                             | 10,25        | 12,69        | 10,07        | 6                             | 15,06        | 18,54        | 14,71        |
| 5                             | 6,09        | 7,58        | 6,02         | 5                             | 10,32        | 12,78        | 10,14        | 5                             | 15,15        | 18,64        | 14,79        |
| 4                             | 6,15        | 7,66        | 6,08         | 4                             | 10,40        | 12,88        | 10,22        | 4                             | 15,23        | 18,74        | 14,87        |
| 3                             | 6,22        | 7,74        | 6,14         | 3                             | 10,48        | 12,97        | 10,29        | 3                             | 15,31        | 18,84        | 14,95        |
| 2                             | 6,28        | 7,82        | 6,21         | 2                             | 10,55        | 13,06        | 10,36        | 2                             | 15,40        | 18,94        | 15,03        |
| 1                             | 6,35        | 7,90        | 6,27         | 1                             | 10,63        | 13,16        | 10,44        | 1                             | 15,48        | 19,04        | 15,11        |
| 0                             | 6,41        | 7,99        | 6,34         | 0                             | 10,71        | 13,25        | 10,52        | 0                             | 15,56        | 19,14        | 15,19        |
| <b>0,9889</b>                 | <b>6,48</b> | <b>8,07</b> | <b>6,40</b>  | <b>0,9829</b>                 | <b>10,78</b> | <b>13,34</b> | <b>10,59</b> | <b>0,9769</b>                 | <b>15,65</b> | <b>19,24</b> | <b>15,27</b> |
| 8                             | 6,55        | 8,15        | 6,47         | 8                             | 10,86        | 13,44        | 10,66        | 8                             | 15,73        | 19,34        | 15,35        |
| 7                             | 6,61        | 8,23        | 6,53         | 7                             | 10,94        | 13,53        | 10,74        | 7                             | 15,81        | 19,44        | 15,43        |
| 6                             | 6,68        | 8,31        | 6,59         | 6                             | 11,01        | 13,63        | 10,81        | 6                             | 15,90        | 19,55        | 15,51        |
| 5                             | 6,75        | 8,40        | 6,66         | 5                             | 11,09        | 13,72        | 10,89        | 5                             | 15,98        | 19,65        | 15,59        |
| 4                             | 6,81        | 8,48        | 6,73         | 4                             | 11,17        | 13,82        | 10,96        | 4                             | 16,06        | 19,75        | 15,67        |
| 3                             | 6,88        | 8,56        | 6,79         | 3                             | 11,25        | 13,91        | 11,04        | 3                             | 16,15        | 19,85        | 15,75        |
| 2                             | 6,95        | 8,64        | 6,86         | 2                             | 11,33        | 14,01        | 11,12        | 2                             | 16,23        | 19,95        | 15,83        |
| 1                             | 7,02        | 8,73        | 6,93         | 1                             | 11,40        | 14,10        | 11,19        | 1                             | 16,32        | 20,05        | 15,91        |
| 0                             | 7,08        | 8,81        | 6,99         | 0                             | 11,48        | 14,20        | 11,27        | 0                             | 16,40        | 20,15        | 15,99        |

Tabelle VIII A. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15}/_{15}$ . 1699

| Scheinbare Dichte $d^{15}/_{15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15}/_{15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15}/_{15}$ | Alkohol      |              |              |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                                  | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                                  | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |
| <b>0,9759</b>                    | <b>16,48</b> | <b>20,25</b> | <b>16,07</b> | <b>0,9699</b>                    | <b>21,40</b> | <b>26,13</b> | <b>20,73</b> | <b>0,9639</b>                    | <b>25,88</b> | <b>31,41</b> | <b>24,92</b> |
| 8                                | 16,57        | 20,35        | 16,15        | 8                                | 21,47        | 26,22        | 20,81        | 8                                | 25,95        | 31,49        | 24,99        |
| 7                                | 16,65        | 20,45        | 16,23        | 7                                | 21,55        | 26,31        | 20,88        | 7                                | 26,02        | 31,57        | 25,05        |
| 6                                | 16,73        | 20,55        | 16,31        | 6                                | 21,63        | 26,41        | 20,96        | 6                                | 26,09        | 31,65        | 25,12        |
| 5                                | 16,82        | 20,65        | 16,39        | 5                                | 21,71        | 26,50        | 21,03        | 5                                | 26,16        | 31,73        | 25,18        |
| 4                                | 16,90        | 20,75        | 16,47        | 4                                | 21,79        | 26,59        | 21,10        | 4                                | 26,23        | 31,81        | 25,25        |
| 3                                | 16,98        | 20,86        | 16,55        | 3                                | 21,87        | 26,69        | 21,18        | 3                                | 26,30        | 31,89        | 25,31        |
| 2                                | 17,07        | 20,96        | 16,63        | 2                                | 21,94        | 26,78        | 21,25        | 2                                | 26,37        | 31,98        | 25,37        |
| 1                                | 17,15        | 21,06        | 16,71        | 1                                | 22,02        | 26,87        | 21,32        | 1                                | 26,44        | 32,06        | 25,44        |
| 0                                | 17,23        | 21,16        | 16,79        | 0                                | 22,10        | 26,96        | 21,40        | 0                                | 26,51        | 32,14        | 25,50        |
| <b>0,9749</b>                    | <b>17,32</b> | <b>21,26</b> | <b>16,87</b> | <b>0,9689</b>                    | <b>22,18</b> | <b>27,05</b> | <b>21,47</b> | <b>0,9629</b>                    | <b>26,57</b> | <b>32,22</b> | <b>25,56</b> |
| 8                                | 17,40        | 21,36        | 16,95        | 8                                | 22,25        | 27,14        | 21,54        | 8                                | 26,64        | 32,30        | 25,63        |
| 7                                | 17,49        | 21,46        | 17,03        | 7                                | 22,33        | 27,24        | 21,61        | 7                                | 26,71        | 32,38        | 25,69        |
| 6                                | 17,57        | 21,56        | 17,11        | 6                                | 22,41        | 27,33        | 21,69        | 6                                | 26,78        | 32,46        | 25,76        |
| 5                                | 17,65        | 21,66        | 17,19        | 5                                | 22,49        | 27,42        | 21,76        | 5                                | 26,85        | 32,54        | 25,82        |
| 4                                | 17,73        | 21,76        | 17,27        | 4                                | 22,56        | 27,51        | 21,83        | 4                                | 26,92        | 32,62        | 25,88        |
| 3                                | 17,82        | 21,86        | 17,35        | 3                                | 22,64        | 27,60        | 21,90        | 3                                | 26,99        | 32,70        | 25,95        |
| 2                                | 17,90        | 21,96        | 17,42        | 2                                | 22,72        | 27,69        | 21,98        | 2                                | 27,05        | 32,78        | 26,01        |
| 1                                | 17,98        | 22,06        | 17,50        | 1                                | 22,79        | 27,78        | 22,05        | 1                                | 27,12        | 32,85        | 26,07        |
| 0                                | 18,07        | 22,16        | 17,58        | 0                                | 22,87        | 27,87        | 22,12        | 0                                | 27,19        | 32,93        | 26,13        |
| <b>0,9739</b>                    | <b>18,15</b> | <b>22,26</b> | <b>17,66</b> | <b>0,9679</b>                    | <b>22,95</b> | <b>27,96</b> | <b>22,19</b> | <b>0,9619</b>                    | <b>27,26</b> | <b>33,01</b> | <b>26,20</b> |
| 8                                | 18,23        | 22,35        | 17,74        | 8                                | 23,02        | 28,05        | 22,26        | 8                                | 27,33        | 33,09        | 26,26        |
| 7                                | 18,32        | 22,45        | 17,82        | 7                                | 23,10        | 28,14        | 22,33        | 7                                | 27,39        | 33,17        | 26,32        |
| 6                                | 18,40        | 22,55        | 17,90        | 6                                | 23,17        | 28,23        | 22,40        | 6                                | 27,46        | 33,25        | 26,38        |
| 5                                | 18,48        | 22,65        | 17,98        | 5                                | 23,25        | 28,32        | 22,47        | 5                                | 27,53        | 33,33        | 26,45        |
| 4                                | 18,56        | 22,75        | 18,05        | 4                                | 23,32        | 28,41        | 22,54        | 4                                | 27,60        | 33,40        | 26,51        |
| 3                                | 18,65        | 22,85        | 18,13        | 3                                | 23,40        | 28,50        | 22,61        | 3                                | 27,66        | 33,48        | 26,57        |
| 2                                | 18,73        | 22,95        | 18,21        | 2                                | 23,47        | 28,59        | 22,68        | 2                                | 27,73        | 33,56        | 26,63        |
| 1                                | 18,81        | 23,05        | 18,29        | 1                                | 23,55        | 28,67        | 22,75        | 1                                | 27,80        | 33,64        | 26,69        |
| 0                                | 18,89        | 23,14        | 18,37        | 0                                | 23,63        | 28,76        | 22,82        | 0                                | 27,86        | 33,71        | 26,75        |
| <b>0,9729</b>                    | <b>18,98</b> | <b>23,24</b> | <b>18,45</b> | <b>0,9669</b>                    | <b>23,70</b> | <b>28,85</b> | <b>22,89</b> | <b>0,9609</b>                    | <b>27,93</b> | <b>33,79</b> | <b>26,82</b> |
| 8                                | 19,06        | 23,34        | 18,52        | 8                                | 23,77        | 28,94        | 22,96        | 8                                | 28,00        | 33,87        | 26,88        |
| 7                                | 19,14        | 23,44        | 18,60        | 7                                | 23,85        | 29,03        | 23,03        | 7                                | 28,06        | 33,94        | 26,94        |
| 6                                | 19,22        | 23,54        | 18,68        | 6                                | 23,92        | 29,11        | 23,10        | 6                                | 28,13        | 34,02        | 27,00        |
| 5                                | 19,30        | 23,63        | 18,76        | 5                                | 24,00        | 29,20        | 23,17        | 5                                | 28,19        | 34,10        | 27,06        |
| 4                                | 19,39        | 23,73        | 18,84        | 4                                | 24,07        | 29,29        | 23,24        | 4                                | 28,26        | 34,17        | 27,12        |
| 3                                | 19,47        | 23,83        | 18,91        | 3                                | 24,15        | 29,38        | 23,31        | 3                                | 28,33        | 34,25        | 27,18        |
| 2                                | 19,55        | 23,93        | 18,99        | 2                                | 24,22        | 29,46        | 23,38        | 2                                | 28,39        | 34,33        | 27,24        |
| 1                                | 19,63        | 24,02        | 19,07        | 1                                | 24,29        | 29,55        | 23,45        | 1                                | 28,46        | 34,40        | 27,30        |
| 0                                | 19,71        | 24,12        | 19,14        | 0                                | 24,37        | 29,64        | 23,52        | 0                                | 28,52        | 34,47        | 27,36        |
| <b>0,9719</b>                    | <b>19,79</b> | <b>24,22</b> | <b>19,22</b> | <b>0,9659</b>                    | <b>24,44</b> | <b>29,72</b> | <b>23,59</b> | <b>0,9599</b>                    | <b>28,59</b> | <b>34,55</b> | <b>27,42</b> |
| 8                                | 19,87        | 24,32        | 19,30        | 8                                | 24,51        | 29,81        | 23,65        | 8                                | 28,65        | 34,63        | 27,48        |
| 7                                | 19,95        | 24,41        | 19,37        | 7                                | 24,59        | 29,89        | 23,72        | 7                                | 28,72        | 34,70        | 27,54        |
| 6                                | 20,04        | 24,51        | 19,45        | 6                                | 24,66        | 29,98        | 23,79        | 6                                | 28,78        | 34,78        | 27,60        |
| 5                                | 20,12        | 24,60        | 19,53        | 5                                | 24,73        | 30,06        | 23,86        | 5                                | 28,85        | 34,85        | 27,66        |
| 4                                | 20,20        | 24,70        | 19,60        | 4                                | 24,80        | 30,15        | 23,93        | 4                                | 28,91        | 34,93        | 27,72        |
| 3                                | 20,28        | 24,80        | 19,68        | 3                                | 24,88        | 30,23        | 23,99        | 3                                | 28,98        | 35,00        | 27,78        |
| 2                                | 20,36        | 24,89        | 19,76        | 2                                | 24,95        | 30,32        | 24,06        | 2                                | 29,04        | 35,08        | 27,84        |
| 1                                | 20,44        | 24,99        | 19,83        | 1                                | 25,02        | 30,40        | 24,13        | 1                                | 29,11        | 35,15        | 27,89        |
| 0                                | 20,52        | 25,08        | 19,91        | 0                                | 25,09        | 30,49        | 24,19        | 0                                | 29,17        | 35,22        | 27,95        |
| <b>0,9709</b>                    | <b>20,60</b> | <b>25,18</b> | <b>19,98</b> | <b>0,9649</b>                    | <b>25,17</b> | <b>30,57</b> | <b>24,26</b> | <b>0,9589</b>                    | <b>29,24</b> | <b>35,30</b> | <b>28,01</b> |
| 8                                | 20,68        | 25,27        | 20,06        | 8                                | 25,24        | 30,66        | 24,33        | 8                                | 29,30        | 35,37        | 28,07        |
| 7                                | 20,76        | 25,37        | 20,13        | 7                                | 25,31        | 30,74        | 24,39        | 7                                | 29,36        | 35,44        | 28,13        |
| 6                                | 20,84        | 25,47        | 20,21        | 6                                | 25,38        | 30,82        | 24,46        | 6                                | 29,43        | 35,52        | 28,19        |
| 5                                | 20,92        | 25,56        | 20,28        | 5                                | 25,45        | 30,91        | 24,53        | 5                                | 29,49        | 35,59        | 28,24        |
| 4                                | 21,00        | 25,66        | 20,36        | 4                                | 25,52        | 30,99        | 24,59        | 4                                | 29,56        | 35,66        | 28,30        |
| 3                                | 21,08        | 25,75        | 20,43        | 3                                | 25,59        | 31,07        | 24,66        | 3                                | 29,62        | 35,74        | 28,36        |
| 2                                | 21,16        | 25,84        | 20,51        | 2                                | 25,66        | 31,16        | 24,73        | 2                                | 29,68        | 35,81        | 28,42        |
| 1                                | 21,24        | 25,94        | 20,58        | 1                                | 25,74        | 31,24        | 24,79        | 1                                | 29,75        | 35,88        | 28,47        |
| 0                                | 21,32        | 26,03        | 20,66        | 0                                | 25,81        | 31,32        | 24,85        | 0                                | 29,81        | 35,95        | 28,53        |

1700 Tabelle VIII A. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15}/_{15}$ .

| Scheinbare Dichte $d^{15}/_{15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15}/_{15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15}/_{15}$ | Alkohol      |              |              |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                                  | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                                  | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |
| <b>0,9579</b>                    | <b>29,87</b> | <b>36,03</b> | <b>28,59</b> | <b>0,9519</b>                    | <b>33,48</b> | <b>40,12</b> | <b>31,84</b> | <b>0,9459</b>                    | <b>36,80</b> | <b>43,83</b> | <b>34,78</b> |
| 8                                | 29,94        | 36,10        | 28,65        | 8                                | 33,54        | 40,19        | 31,89        | 8                                | 36,85        | 43,88        | 34,83        |
| 7                                | 30,00        | 36,17        | 28,70        | 7                                | 33,59        | 40,25        | 31,94        | 7                                | 36,91        | 43,94        | 34,87        |
| 6                                | 30,06        | 36,24        | 28,76        | 6                                | 33,65        | 40,32        | 32,00        | 6                                | 36,96        | 44,00        | 34,92        |
| 5                                | 30,12        | 36,31        | 28,82        | 5                                | 33,71        | 40,38        | 32,05        | 5                                | 37,01        | 44,06        | 34,96        |
| 4                                | 30,18        | 36,38        | 28,87        | 4                                | 33,76        | 40,44        | 32,10        | 4                                | 37,06        | 44,12        | 35,01        |
| 3                                | 30,25        | 36,46        | 28,93        | 3                                | 33,82        | 40,51        | 32,15        | 3                                | 37,12        | 44,18        | 35,06        |
| 2                                | 30,31        | 36,53        | 28,99        | 2                                | 33,88        | 40,57        | 32,20        | 2                                | 37,17        | 44,23        | 35,10        |
| 1                                | 30,37        | 36,60        | 29,04        | 1                                | 33,94        | 40,64        | 32,25        | 1                                | 37,22        | 44,29        | 35,15        |
| 0                                | 30,43        | 36,67        | 29,10        | 0                                | 33,99        | 40,70        | 32,30        | 0                                | 37,28        | 44,35        | 35,20        |
| <b>0,9569</b>                    | <b>30,50</b> | <b>36,74</b> | <b>29,16</b> | <b>0,9509</b>                    | <b>34,05</b> | <b>40,76</b> | <b>32,35</b> | <b>0,9449</b>                    | <b>37,33</b> | <b>44,41</b> | <b>35,24</b> |
| 8                                | 30,56        | 36,81        | 29,21        | 8                                | 34,11        | 40,83        | 32,40        | 8                                | 37,38        | 44,47        | 35,29        |
| 7                                | 30,62        | 36,88        | 29,27        | 7                                | 34,16        | 40,89        | 32,45        | 7                                | 37,44        | 44,53        | 35,34        |
| 6                                | 30,68        | 36,95        | 29,33        | 6                                | 34,22        | 40,96        | 32,50        | 6                                | 37,49        | 44,59        | 35,38        |
| 5                                | 30,74        | 37,02        | 29,38        | 5                                | 34,28        | 41,02        | 32,55        | 5                                | 37,54        | 44,64        | 35,43        |
| 4                                | 30,81        | 37,09        | 29,44        | 4                                | 34,33        | 41,08        | 32,60        | 4                                | 37,59        | 44,70        | 35,47        |
| 3                                | 30,87        | 37,16        | 29,49        | 3                                | 34,39        | 41,15        | 32,65        | 3                                | 37,65        | 44,76        | 35,52        |
| 2                                | 30,93        | 37,23        | 29,55        | 2                                | 34,44        | 41,21        | 32,70        | 2                                | 37,70        | 44,82        | 35,57        |
| 1                                | 30,99        | 37,30        | 29,60        | 1                                | 34,50        | 41,27        | 32,75        | 1                                | 37,75        | 44,87        | 35,61        |
| 0                                | 31,05        | 37,37        | 29,66        | 0                                | 34,56        | 41,33        | 32,80        | 0                                | 37,80        | 44,93        | 35,66        |
| <b>0,9559</b>                    | <b>31,11</b> | <b>37,44</b> | <b>29,71</b> | <b>0,9499</b>                    | <b>34,61</b> | <b>41,40</b> | <b>32,85</b> | <b>0,9439</b>                    | <b>37,86</b> | <b>44,99</b> | <b>35,70</b> |
| 8                                | 31,17        | 37,51        | 29,77        | 8                                | 34,67        | 41,46        | 32,90        | 8                                | 37,91        | 45,05        | 35,75        |
| 7                                | 31,23        | 37,58        | 29,82        | 7                                | 34,72        | 41,52        | 32,95        | 7                                | 37,96        | 45,10        | 35,79        |
| 6                                | 31,29        | 37,65        | 29,88        | 6                                | 34,78        | 41,58        | 33,00        | 6                                | 38,01        | 45,16        | 35,84        |
| 5                                | 31,36        | 37,72        | 29,93        | 5                                | 34,84        | 41,64        | 33,05        | 5                                | 38,07        | 45,22        | 35,88        |
| 4                                | 31,42        | 37,79        | 29,99        | 4                                | 34,89        | 41,71        | 33,10        | 4                                | 38,12        | 45,28        | 35,93        |
| 3                                | 31,48        | 37,86        | 30,04        | 3                                | 34,95        | 41,77        | 33,15        | 3                                | 38,17        | 45,33        | 35,97        |
| 2                                | 31,54        | 37,93        | 30,10        | 2                                | 35,00        | 41,83        | 33,20        | 2                                | 38,22        | 45,39        | 36,02        |
| 1                                | 31,60        | 38,00        | 30,15        | 1                                | 35,06        | 41,89        | 33,25        | 1                                | 38,27        | 45,45        | 36,06        |
| 0                                | 31,66        | 38,06        | 30,21        | 0                                | 35,11        | 41,95        | 33,30        | 0                                | 38,33        | 45,50        | 36,11        |
| <b>0,9549</b>                    | <b>31,72</b> | <b>38,13</b> | <b>30,26</b> | <b>0,9489</b>                    | <b>35,17</b> | <b>42,02</b> | <b>33,34</b> | <b>0,9429</b>                    | <b>38,38</b> | <b>45,56</b> | <b>36,16</b> |
| 8                                | 31,78        | 38,20        | 30,31        | 8                                | 35,22        | 42,08        | 33,39        | 8                                | 38,43        | 45,62        | 36,20        |
| 7                                | 31,84        | 38,27        | 30,37        | 7                                | 35,28        | 42,14        | 33,44        | 7                                | 38,48        | 45,67        | 36,25        |
| 6                                | 31,90        | 38,34        | 30,42        | 6                                | 35,33        | 42,20        | 33,49        | 6                                | 38,53        | 45,73        | 36,29        |
| 5                                | 31,96        | 38,40        | 30,48        | 5                                | 35,39        | 42,26        | 33,54        | 5                                | 38,59        | 45,79        | 36,34        |
| 4                                | 31,01        | 38,47        | 30,53        | 4                                | 35,44        | 42,32        | 33,59        | 4                                | 38,64        | 45,84        | 36,38        |
| 3                                | 32,07        | 38,54        | 30,58        | 3                                | 35,50        | 42,39        | 33,64        | 3                                | 38,69        | 45,90        | 36,43        |
| 2                                | 32,13        | 38,61        | 30,64        | 2                                | 35,55        | 42,45        | 33,69        | 2                                | 38,74        | 45,95        | 36,47        |
| 1                                | 32,19        | 38,67        | 30,69        | 1                                | 35,61        | 42,51        | 33,73        | 1                                | 38,79        | 46,01        | 36,51        |
| 0                                | 32,25        | 38,74        | 30,74        | 0                                | 35,66        | 42,57        | 33,78        | 0                                | 38,84        | 46,07        | 36,56        |
| <b>0,9539</b>                    | <b>32,31</b> | <b>38,81</b> | <b>30,80</b> | <b>0,9479</b>                    | <b>35,72</b> | <b>42,63</b> | <b>33,83</b> | <b>0,9419</b>                    | <b>38,89</b> | <b>46,12</b> | <b>36,60</b> |
| 8                                | 32,37        | 38,88        | 30,85        | 8                                | 35,77        | 42,69        | 33,88        | 8                                | 38,94        | 46,18        | 36,65        |
| 7                                | 32,43        | 38,94        | 30,90        | 7                                | 35,83        | 42,75        | 33,92        | 7                                | 39,00        | 46,24        | 36,69        |
| 6                                | 32,49        | 39,01        | 30,96        | 6                                | 35,88        | 42,81        | 33,97        | 6                                | 39,05        | 46,29        | 36,74        |
| 5                                | 32,55        | 39,07        | 31,01        | 5                                | 35,94        | 42,87        | 34,02        | 5                                | 39,10        | 46,35        | 36,78        |
| 4                                | 32,61        | 39,14        | 31,06        | 4                                | 35,99        | 42,93        | 34,07        | 4                                | 39,15        | 46,40        | 36,82        |
| 3                                | 32,67        | 39,21        | 31,11        | 3                                | 36,04        | 42,99        | 34,12        | 3                                | 39,20        | 46,46        | 36,87        |
| 2                                | 32,72        | 39,27        | 31,17        | 2                                | 36,10        | 43,05        | 34,16        | 2                                | 39,25        | 46,51        | 36,91        |
| 1                                | 32,78        | 39,34        | 31,22        | 1                                | 36,15        | 43,11        | 34,21        | 1                                | 39,30        | 46,57        | 36,96        |
| 0                                | 32,84        | 39,40        | 31,27        | 0                                | 36,21        | 43,17        | 34,26        | 0                                | 39,35        | 46,63        | 37,00        |
| <b>0,9529</b>                    | <b>32,90</b> | <b>39,47</b> | <b>31,32</b> | <b>0,9469</b>                    | <b>36,26</b> | <b>43,23</b> | <b>34,31</b> | <b>0,9409</b>                    | <b>39,40</b> | <b>46,68</b> | <b>37,05</b> |
| 8                                | 32,96        | 39,54        | 31,38        | 8                                | 36,32        | 43,29        | 34,35        | 8                                | 39,46        | 46,74        | 37,09        |
| 7                                | 33,02        | 39,60        | 31,43        | 7                                | 36,37        | 43,35        | 34,40        | 7                                | 39,51        | 46,79        | 37,13        |
| 6                                | 33,07        | 39,67        | 31,48        | 6                                | 36,42        | 43,41        | 34,45        | 6                                | 39,56        | 46,85        | 37,18        |
| 5                                | 33,13        | 39,73        | 31,53        | 5                                | 36,48        | 43,47        | 34,50        | 5                                | 39,61        | 46,90        | 37,22        |
| 4                                | 33,19        | 39,80        | 31,58        | 4                                | 36,53        | 43,53        | 34,54        | 4                                | 39,66        | 46,96        | 37,26        |
| 3                                | 33,25        | 39,86        | 31,63        | 3                                | 36,58        | 43,59        | 34,59        | 3                                | 39,71        | 47,01        | 37,31        |
| 2                                | 33,31        | 39,93        | 31,69        | 2                                | 36,64        | 43,65        | 34,64        | 2                                | 39,76        | 47,07        | 37,35        |
| 1                                | 33,36        | 39,99        | 31,74        | 1                                | 36,69        | 43,71        | 34,69        | 1                                | 39,81        | 47,12        | 37,39        |
| 0                                | 33,42        | 40,06        | 31,79        | 0                                | 36,75        | 43,77        | 34,73        | 0                                | 39,86        | 47,18        | 37,44        |

Tabelle VIII A. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15/15}$ . 1701

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                               | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |
| <b>0,9399</b>                 | <b>39,91</b> | <b>47,23</b> | <b>37,48</b> | <b>0,9339</b>                 | <b>42,88</b> | <b>50,42</b> | <b>40,01</b> | <b>0,9279</b>                 | <b>45,74</b> | <b>53,43</b> | <b>42,40</b> |
| 8                             | 39,96        | 47,29        | 37,53        | 8                             | 42,93        | 50,47        | 40,05        | 8                             | 45,78        | 53,48        | 42,44        |
| 7                             | 40,01        | 47,34        | 37,57        | 7                             | 42,98        | 50,52        | 40,09        | 7                             | 45,83        | 53,53        | 42,48        |
| 6                             | 40,06        | 47,40        | 37,61        | 6                             | 43,02        | 50,57        | 40,13        | 6                             | 45,88        | 53,58        | 42,52        |
| 5                             | 40,11        | 47,45        | 37,66        | 5                             | 43,07        | 50,62        | 40,17        | 5                             | 45,93        | 53,63        | 42,56        |
| 4                             | 40,16        | 47,51        | 37,70        | 4                             | 43,12        | 50,68        | 40,22        | 4                             | 45,97        | 53,68        | 42,60        |
| 3                             | 40,22        | 47,56        | 37,74        | 3                             | 43,17        | 50,73        | 40,26        | 3                             | 46,02        | 53,73        | 42,64        |
| 2                             | 40,27        | 47,61        | 37,79        | 2                             | 43,22        | 50,78        | 40,30        | 2                             | 46,07        | 53,78        | 42,68        |
| 1                             | 40,32        | 47,67        | 37,83        | 1                             | 43,27        | 50,83        | 40,34        | 1                             | 46,11        | 53,83        | 42,72        |
| 0                             | 40,37        | 47,72        | 37,87        | 0                             | 43,31        | 50,88        | 40,38        | 0                             | 46,16        | 53,88        | 42,76        |
| <b>0,9389</b>                 | <b>40,42</b> | <b>47,78</b> | <b>37,92</b> | <b>0,9329</b>                 | <b>43,36</b> | <b>50,93</b> | <b>40,42</b> | <b>0,9269</b>                 | <b>46,21</b> | <b>53,92</b> | <b>42,79</b> |
| 8                             | 40,47        | 47,83        | 37,96        | 8                             | 43,41        | 50,98        | 40,46        | 8                             | 46,25        | 53,97        | 42,83        |
| 7                             | 40,52        | 47,89        | 38,00        | 7                             | 43,46        | 51,03        | 40,50        | 7                             | 46,30        | 54,02        | 42,87        |
| 6                             | 40,57        | 47,94        | 38,04        | 6                             | 43,51        | 51,08        | 40,54        | 6                             | 46,35        | 54,07        | 42,91        |
| 5                             | 40,62        | 47,99        | 38,09        | 5                             | 43,55        | 51,14        | 40,58        | 5                             | 46,39        | 54,12        | 42,95        |
| 4                             | 40,67        | 48,05        | 38,13        | 4                             | 43,60        | 51,19        | 40,62        | 4                             | 46,44        | 54,17        | 42,98        |
| 3                             | 40,72        | 48,10        | 38,17        | 3                             | 43,65        | 51,24        | 40,66        | 3                             | 46,49        | 54,21        | 43,02        |
| 2                             | 40,77        | 48,15        | 38,21        | 2                             | 43,70        | 51,29        | 40,70        | 2                             | 46,53        | 54,26        | 43,06        |
| 1                             | 40,82        | 48,21        | 38,26        | 1                             | 43,75        | 51,34        | 40,74        | 1                             | 46,58        | 54,31        | 43,10        |
| 0                             | 40,87        | 48,26        | 38,30        | 0                             | 43,79        | 51,39        | 40,78        | 0                             | 46,63        | 54,36        | 43,14        |
| <b>0,9379</b>                 | <b>40,92</b> | <b>48,32</b> | <b>38,34</b> | <b>0,9319</b>                 | <b>43,84</b> | <b>51,44</b> | <b>40,82</b> | <b>0,9259</b>                 | <b>46,67</b> | <b>54,41</b> | <b>43,18</b> |
| 8                             | 40,97        | 48,37        | 38,38        | 8                             | 43,89        | 51,49        | 40,86        | 8                             | 46,72        | 54,46        | 43,22        |
| 7                             | 41,01        | 48,42        | 38,43        | 7                             | 43,94        | 51,54        | 40,90        | 7                             | 46,77        | 54,50        | 43,25        |
| 6                             | 41,06        | 48,48        | 38,47        | 6                             | 43,99        | 51,59        | 40,94        | 6                             | 46,81        | 54,55        | 43,29        |
| 5                             | 41,11        | 48,53        | 38,51        | 5                             | 44,03        | 51,64        | 40,98        | 5                             | 46,86        | 54,60        | 43,33        |
| 4                             | 41,16        | 48,58        | 38,55        | 4                             | 44,08        | 51,69        | 41,02        | 4                             | 46,90        | 54,65        | 43,37        |
| 3                             | 41,21        | 48,64        | 38,60        | 3                             | 44,13        | 51,74        | 41,06        | 3                             | 46,95        | 54,70        | 43,41        |
| 2                             | 41,26        | 48,69        | 38,64        | 2                             | 44,18        | 51,79        | 41,10        | 2                             | 47,00        | 54,75        | 43,45        |
| 1                             | 41,31        | 48,74        | 38,68        | 1                             | 44,22        | 51,84        | 41,14        | 1                             | 47,04        | 54,80        | 43,48        |
| 0                             | 41,36        | 48,80        | 38,72        | 0                             | 44,27        | 51,89        | 41,18        | 0                             | 47,09        | 54,84        | 43,52        |
| <b>0,9369</b>                 | <b>41,41</b> | <b>48,85</b> | <b>38,77</b> | <b>0,9309</b>                 | <b>44,32</b> | <b>51,94</b> | <b>41,22</b> | <b>0,9249</b>                 | <b>47,14</b> | <b>54,89</b> | <b>43,56</b> |
| 8                             | 41,46        | 48,90        | 38,81        | 8                             | 44,37        | 51,99        | 41,26        | 8                             | 47,18        | 54,94        | 43,60        |
| 7                             | 41,51        | 48,96        | 38,85        | 7                             | 44,41        | 52,04        | 41,30        | 7                             | 47,23        | 54,99        | 43,64        |
| 6                             | 41,56        | 49,01        | 38,89        | 6                             | 44,46        | 52,09        | 41,34        | 6                             | 47,28        | 55,03        | 43,67        |
| 5                             | 41,61        | 49,06        | 38,93        | 5                             | 44,51        | 52,14        | 41,38        | 5                             | 47,32        | 55,08        | 43,71        |
| 4                             | 41,66        | 49,11        | 38,98        | 4                             | 44,56        | 52,19        | 41,42        | 4                             | 47,37        | 55,13        | 43,75        |
| 3                             | 41,71        | 49,17        | 39,02        | 3                             | 44,60        | 52,24        | 41,46        | 3                             | 47,41        | 55,18        | 43,79        |
| 2                             | 41,76        | 49,22        | 39,06        | 2                             | 44,65        | 52,29        | 41,50        | 2                             | 47,46        | 55,23        | 43,83        |
| 1                             | 41,81        | 49,27        | 39,10        | 1                             | 44,70        | 52,34        | 41,54        | 1                             | 47,51        | 55,27        | 43,86        |
| 0                             | 41,85        | 49,33        | 39,14        | 0                             | 44,75        | 52,39        | 41,58        | 0                             | 47,55        | 55,32        | 43,90        |
| <b>0,9359</b>                 | <b>41,90</b> | <b>49,38</b> | <b>39,18</b> | <b>0,9299</b>                 | <b>44,79</b> | <b>52,44</b> | <b>41,62</b> | <b>0,9239</b>                 | <b>47,60</b> | <b>55,37</b> | <b>43,94</b> |
| 8                             | 41,95        | 49,43        | 39,23        | 8                             | 44,84        | 52,49        | 41,66        | 8                             | 47,64        | 55,42        | 43,98        |
| 7                             | 42,00        | 49,48        | 39,27        | 7                             | 44,89        | 52,54        | 41,70        | 7                             | 47,69        | 55,46        | 44,01        |
| 6                             | 42,05        | 49,53        | 39,31        | 6                             | 44,94        | 52,59        | 41,74        | 6                             | 47,74        | 55,51        | 44,05        |
| 5                             | 42,10        | 49,59        | 39,35        | 5                             | 44,98        | 52,64        | 41,78        | 5                             | 47,78        | 55,56        | 44,09        |
| 4                             | 42,15        | 49,64        | 39,39        | 4                             | 45,03        | 52,69        | 41,82        | 4                             | 47,83        | 55,61        | 44,13        |
| 3                             | 42,20        | 49,69        | 39,43        | 3                             | 45,08        | 52,74        | 41,86        | 3                             | 47,88        | 55,65        | 44,17        |
| 2                             | 42,25        | 49,74        | 39,47        | 2                             | 45,13        | 52,79        | 41,90        | 2                             | 47,92        | 55,70        | 44,20        |
| 1                             | 42,30        | 49,80        | 39,52        | 1                             | 45,17        | 52,84        | 41,93        | 1                             | 47,97        | 55,75        | 44,24        |
| 0                             | 42,34        | 49,85        | 39,56        | 0                             | 45,22        | 52,89        | 41,97        | 0                             | 48,01        | 55,80        | 44,28        |
| <b>0,9349</b>                 | <b>42,39</b> | <b>49,90</b> | <b>39,60</b> | <b>0,9289</b>                 | <b>45,27</b> | <b>52,94</b> | <b>42,01</b> | <b>0,9229</b>                 | <b>48,06</b> | <b>55,84</b> | <b>44,32</b> |
| 8                             | 42,44        | 49,95        | 39,64        | 8                             | 45,31        | 52,99        | 42,05        | 8                             | 48,10        | 55,89        | 44,36        |
| 7                             | 42,49        | 50,00        | 39,68        | 7                             | 45,36        | 53,04        | 42,09        | 7                             | 48,15        | 55,94        | 44,39        |
| 6                             | 42,54        | 50,06        | 39,72        | 6                             | 45,41        | 53,09        | 42,13        | 6                             | 48,20        | 55,99        | 44,43        |
| 5                             | 42,59        | 50,11        | 39,76        | 5                             | 45,46        | 53,14        | 42,17        | 5                             | 48,24        | 56,03        | 44,47        |
| 4                             | 42,64        | 50,16        | 39,81        | 4                             | 45,50        | 53,19        | 42,21        | 4                             | 48,29        | 56,08        | 44,50        |
| 3                             | 42,68        | 50,21        | 39,85        | 3                             | 45,55        | 53,24        | 42,25        | 3                             | 48,33        | 56,13        | 44,54        |
| 2                             | 42,73        | 50,26        | 39,89        | 2                             | 45,60        | 53,29        | 42,29        | 2                             | 48,38        | 56,18        | 44,58        |
| 1                             | 42,78        | 50,31        | 39,93        | 1                             | 45,64        | 53,34        | 42,33        | 1                             | 48,43        | 56,22        | 44,62        |
| 0                             | 42,83        | 50,37        | 39,97        | 0                             | 45,69        | 53,39        | 42,37        | 0                             | 48,47        | 56,27        | 44,65        |

1702 Tabelle VIII. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15/15}$ .

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                               | Gew.-%       | Raum.-%      | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum.-%      | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum.-%      | g in 100 ccm |
| <b>0,9219</b>                 | <b>48,52</b> | <b>56,32</b> | <b>44,69</b> | 4                             | 51,02        | 58,86        | 46,71        | <b>0,9109</b>                 | <b>53,48</b> | <b>61,33</b> | <b>48,67</b> |
| 8                             | 48,56        | 56,36        | 44,73        | 3                             | 51,06        | 58,91        | 46,75        | 8                             | 53,52        | 61,37        | 48,71        |
| 7                             | 48,61        | 56,41        | 44,77        | 2                             | 51,11        | 58,95        | 46,78        | 7                             | 53,57        | 61,42        | 48,74        |
| 6                             | 48,66        | 56,46        | 44,80        | 1                             | 51,15        | 59,00        | 46,82        | 6                             | 53,61        | 61,46        | 48,78        |
| 5                             | 48,70        | 56,50        | 44,84        | 0                             | 51,20        | 59,05        | 46,86        | 5                             | 53,65        | 61,51        | 48,81        |
| 4                             | 48,75        | 56,55        | 44,88        |                               |              |              |              | 4                             | 53,70        | 61,55        | 48,85        |
| 3                             | 48,79        | 56,60        | 44,92        | <b>0,9159</b>                 | <b>51,24</b> | <b>59,09</b> | <b>46,89</b> | 3                             | 53,74        | 61,60        | 48,88        |
| 2                             | 48,84        | 56,64        | 44,95        | 8                             | 51,29        | 59,14        | 46,93        | 2                             | 53,79        | 61,64        | 48,92        |
| 1                             | 48,88        | 56,69        | 44,99        | 7                             | 51,33        | 59,18        | 46,96        | 1                             | 53,83        | 61,68        | 48,95        |
| 0                             | 48,93        | 56,74        | 45,03        | 6                             | 51,38        | 59,23        | 47,00        | 0                             | 53,88        | 61,73        | 48,99        |
|                               |              |              |              | 5                             | 51,42        | 59,27        | 47,04        | <b>0,9099</b>                 | <b>53,92</b> | <b>61,77</b> | <b>49,02</b> |
| <b>0,9209</b>                 | <b>48,98</b> | <b>56,78</b> | <b>45,06</b> | 4                             | 51,47        | 59,32        | 47,07        | 8                             | 53,97        | 61,82        | 49,06        |
| 8                             | 49,02        | 56,83        | 45,10        | 3                             | 51,51        | 59,36        | 47,11        | 7                             | 54,01        | 61,86        | 49,09        |
| 7                             | 49,07        | 56,88        | 45,14        | 2                             | 51,56        | 59,41        | 47,14        | 6                             | 54,05        | 61,90        | 49,13        |
| 6                             | 49,11        | 56,93        | 45,17        | 1                             | 51,60        | 59,45        | 47,18        | 5                             | 54,10        | 61,95        | 49,16        |
| 5                             | 49,16        | 56,97        | 45,21        | 0                             | 51,65        | 59,50        | 47,22        | 4                             | 54,14        | 61,99        | 49,20        |
| 4                             | 49,20        | 57,02        | 45,25        |                               |              |              |              | 3                             | 54,19        | 62,04        | 49,23        |
| 3                             | 49,25        | 57,07        | 45,29        | <b>0,9149</b>                 | <b>51,69</b> | <b>59,54</b> | <b>47,25</b> | 2                             | 54,23        | 62,08        | 49,27        |
| 2                             | 49,29        | 57,11        | 45,32        | 8                             | 51,73        | 59,59        | 47,29        | 1                             | 54,28        | 62,13        | 49,30        |
| 1                             | 49,34        | 57,16        | 45,36        | 7                             | 51,78        | 59,63        | 47,32        | 0                             | 54,32        | 62,17        | 49,33        |
| 0                             | 49,39        | 57,21        | 45,40        | 6                             | 51,82        | 59,68        | 47,36        | <b>0,9089</b>                 | <b>54,36</b> | <b>62,21</b> | <b>49,37</b> |
|                               |              |              |              | 5                             | 51,87        | 59,72        | 47,39        | 8                             | 54,41        | 62,26        | 49,41        |
| <b>0,9199</b>                 | <b>49,43</b> | <b>57,25</b> | <b>45,43</b> | 4                             | 51,91        | 59,77        | 47,43        | 7                             | 54,45        | 62,30        | 49,44        |
| 8                             | 49,48        | 57,30        | 45,47        | 3                             | 51,96        | 59,81        | 47,47        | 6                             | 54,50        | 62,34        | 49,47        |
| 7                             | 49,52        | 57,34        | 45,51        | 2                             | 52,00        | 59,86        | 47,50        | 5                             | 54,54        | 62,39        | 49,51        |
| 6                             | 49,57        | 57,39        | 45,54        | 1                             | 52,05        | 59,90        | 47,54        | 4                             | 54,59        | 62,43        | 49,54        |
| 5                             | 49,61        | 57,44        | 45,58        | 0                             | 52,09        | 59,95        | 47,57        | 3                             | 54,63        | 62,47        | 49,58        |
| 4                             | 49,66        | 57,48        | 45,62        |                               |              |              |              | 2                             | 54,67        | 62,52        | 49,61        |
| 3                             | 49,70        | 57,53        | 45,66        | <b>0,9139</b>                 | <b>52,14</b> | <b>59,99</b> | <b>47,61</b> | 1                             | 54,72        | 62,56        | 49,65        |
| 2                             | 49,75        | 57,58        | 45,69        | 8                             | 52,18        | 60,04        | 47,64        | 0                             | 54,76        | 62,61        | 49,68        |
| 1                             | 49,80        | 57,62        | 45,73        | 7                             | 52,23        | 60,08        | 47,68        | <b>0,9079</b>                 | <b>54,81</b> | <b>62,65</b> | <b>49,72</b> |
| 0                             | 49,84        | 57,67        | 45,76        | 6                             | 52,27        | 60,13        | 47,72        | 8                             | 54,85        | 62,69        | 49,75        |
|                               |              |              |              | 5                             | 52,32        | 60,17        | 47,75        | 7                             | 54,90        | 62,74        | 49,79        |
| <b>0,9189</b>                 | <b>49,89</b> | <b>57,72</b> | <b>45,80</b> | 4                             | 52,36        | 60,22        | 47,79        | 6                             | 54,94        | 62,78        | 49,82        |
| 8                             | 49,93        | 57,76        | 45,84        | 3                             | 52,41        | 60,26        | 47,82        | 5                             | 54,98        | 62,82        | 49,86        |
| 7                             | 49,98        | 57,81        | 45,87        | 2                             | 52,45        | 60,31        | 47,85        | 4                             | 55,03        | 62,87        | 49,89        |
| 6                             | 50,02        | 57,85        | 45,91        | 1                             | 52,50        | 60,35        | 47,89        | 3                             | 55,07        | 62,91        | 49,92        |
| 5                             | 50,07        | 57,90        | 45,95        | 0                             | 52,54        | 60,40        | 47,93        | 2                             | 55,12        | 62,95        | 49,96        |
| 4                             | 50,11        | 57,95        | 45,98        |                               |              |              |              | 1                             | 55,16        | 63,00        | 49,99        |
| 3                             | 50,16        | 57,99        | 46,02        | <b>0,9129</b>                 | <b>52,59</b> | <b>60,44</b> | <b>47,96</b> | 0                             | 55,20        | 63,04        | 50,03        |
| 2                             | 50,20        | 58,04        | 46,06        | 8                             | 52,63        | 60,49        | 48,00        | <b>0,9069</b>                 | <b>55,25</b> | <b>63,08</b> | <b>50,06</b> |
| 1                             | 50,25        | 58,08        | 46,09        | 7                             | 52,67        | 60,53        | 48,04        | 65                            | 55,43        | 63,26        | 50,20        |
| 0                             | 50,29        | 58,13        | 46,13        | 6                             | 52,72        | 60,58        | 48,07        | 60                            | 55,65        | 63,47        | 50,37        |
|                               |              |              |              | 5                             | 52,76        | 60,62        | 48,11        | 55                            | 55,87        | 63,69        | 50,54        |
| <b>0,9179</b>                 | <b>50,34</b> | <b>58,18</b> | <b>46,17</b> | 4                             | 52,81        | 60,67        | 48,14        | 50                            | 56,09        | 63,91        | 50,71        |
| 8                             | 50,38        | 58,22        | 46,20        | 3                             | 52,85        | 60,71        | 48,18        | 45                            | 56,31        | 64,12        | 50,89        |
| 7                             | 50,43        | 58,27        | 46,24        | 2                             | 52,90        | 60,75        | 48,21        | 40                            | 56,52        | 64,34        | 51,06        |
| 6                             | 50,47        | 58,31        | 46,28        | 1                             | 52,94        | 60,80        | 48,25        | 35                            | 56,74        | 64,55        | 51,23        |
| 5                             | 50,52        | 58,36        | 46,31        | 0                             | 52,99        | 60,84        | 48,28        | 30                            | 56,96        | 64,76        | 51,39        |
| 4                             | 50,57        | 58,41        | 46,35        |                               |              |              |              | 25                            | 57,18        | 64,98        | 51,56        |
| 3                             | 50,61        | 58,45        | 46,39        | <b>0,9119</b>                 | <b>53,03</b> | <b>60,89</b> | <b>48,32</b> | 20                            | 57,40        | 65,19        | 51,73        |
| 2                             | 50,66        | 58,50        | 46,42        | 8                             | 53,08        | 60,93        | 48,35        | 15                            | 57,62        | 65,40        | 51,90        |
| 1                             | 50,70        | 58,54        | 46,46        | 7                             | 53,12        | 60,98        | 48,39        | 10                            | 57,84        | 65,61        | 52,07        |
| 0                             | 50,75        | 58,59        | 46,49        | 6                             | 53,17        | 61,02        | 48,42        | 05                            | 58,06        | 65,82        | 52,24        |
|                               |              |              |              | 5                             | 53,21        | 61,06        | 48,46        | <b>0,9000</b>                 | <b>58,27</b> | <b>66,03</b> | <b>52,40</b> |
| <b>0,9169</b>                 | <b>50,79</b> | <b>58,63</b> | <b>46,53</b> | 4                             | 53,25        | 61,11        | 48,49        | <b>0,8995</b>                 | <b>58,49</b> | <b>66,24</b> | <b>52,57</b> |
| 8                             | 50,84        | 58,68        | 46,57        | 3                             | 53,30        | 61,15        | 48,53        | 90                            | 58,71        | 66,45        | 52,74        |
| 7                             | 50,88        | 58,73        | 46,60        | 2                             | 53,34        | 61,20        | 48,56        | 85                            | 58,93        | 66,66        | 52,90        |
| 6                             | 50,93        | 58,77        | 46,64        | 1                             | 53,39        | 61,24        | 48,60        | 80                            | 59,15        | 66,87        | 53,07        |
| 5                             | 50,97        | 58,82        | 46,67        | 0                             | 53,43        | 61,29        | 48,64        |                               |              |              |              |

Tabelle VIII A. Bestimmung des Alkohols nach K. WINDISCH aus  $d^{15/15}$ . 1703

| Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              | Scheinbare Dichte $d^{15/15}$ | Alkohol      |              |              |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                               | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |                               | Gew.-%       | Raum-%       | g in 100 ccm |
| 0,8975                        | 59,36        | 67,08        | 53,23        | 75                            | 72,16        | 78,82        | 62,55        | 75                            | 84,42        | 89,02        | 70,65        |
| 70                            | 59,58        | 67,29        | 53,40        | 70                            | 72,37        | 79,00        | 62,69        | 70                            | 84,62        | 89,18        | 70,77        |
| 65                            | 59,80        | 67,50        | 53,56        | 65                            | 72,58        | 79,18        | 62,84        | 65                            | 84,82        | 89,33        | 70,89        |
| 60                            | 60,02        | 67,70        | 53,73        | 60                            | 72,79        | 79,37        | 62,98        | 60                            | 85,01        | 89,48        | 71,01        |
| 55                            | 60,23        | 67,91        | 53,89        | 55                            | 73,00        | 79,55        | 63,13        | 55                            | 85,21        | 89,64        | 71,14        |
| <b>0,8950</b>                 | <b>60,45</b> | <b>68,12</b> | <b>54,05</b> | <b>0,8650</b>                 | <b>73,21</b> | <b>79,73</b> | <b>63,27</b> | <b>0,8350</b>                 | <b>85,41</b> | <b>89,79</b> | <b>71,26</b> |
| 45                            | 60,66        | 68,32        | 54,22        | 45                            | 73,42        | 79,91        | 63,41        | 45                            | 85,60        | 89,94        | 71,38        |
| 40                            | 60,88        | 68,53        | 54,38        | 40                            | 73,63        | 80,09        | 63,56        | 40                            | 85,80        | 90,09        | 71,50        |
| 35                            | 61,10        | 68,73        | 54,54        | 35                            | 73,83        | 80,27        | 63,70        | 35                            | 85,99        | 90,24        | 71,62        |
| 30                            | 61,31        | 68,94        | 54,71        | 30                            | 74,04        | 80,45        | 63,85        | 30                            | 86,19        | 90,40        | 71,74        |
| 25                            | 61,53        | 69,14        | 54,87        | 25                            | 74,25        | 80,63        | 63,99        | 25                            | 86,38        | 90,55        | 71,85        |
| 20                            | 61,75        | 69,34        | 55,03        | 20                            | 74,46        | 80,81        | 64,13        | 20                            | 86,58        | 90,70        | 71,97        |
| 15                            | 61,96        | 69,55        | 55,19        | 15                            | 74,67        | 80,99        | 64,27        | 15                            | 86,77        | 90,84        | 72,09        |
| 10                            | 62,18        | 69,75        | 55,35        | 10                            | 74,87        | 81,17        | 64,41        | 10                            | 86,97        | 90,99        | 72,21        |
| 05                            | 62,39        | 69,95        | 55,51        | 05                            | 75,08        | 81,34        | 64,55        | 05                            | 87,16        | 91,14        | 72,33        |
| <b>0,8900</b>                 | <b>62,61</b> | <b>70,16</b> | <b>55,67</b> | <b>0,8600</b>                 | <b>75,29</b> | <b>81,52</b> | <b>64,69</b> | <b>0,8300</b>                 | <b>87,35</b> | <b>91,29</b> | <b>72,44</b> |
| 0,8895                        | 62,82        | 70,36        | 55,83        | 0,8595                        | 75,50        | 81,70        | 64,84        | 0,8295                        | 87,55        | 91,43        | 72,56        |
| 90                            | 63,04        | 70,56        | 55,99        | 90                            | 75,70        | 81,87        | 64,97        | 90                            | 87,74        | 91,58        | 72,67        |
| 85                            | 63,25        | 70,76        | 56,15        | 85                            | 75,91        | 82,05        | 65,11        | 85                            | 87,93        | 91,72        | 72,79        |
| 80                            | 63,47        | 70,96        | 56,31        | 80                            | 76,12        | 82,23        | 65,25        | 80                            | 88,12        | 91,87        | 72,90        |
| 75                            | 63,68        | 71,16        | 56,47        | 75                            | 76,32        | 82,40        | 65,39        | 75                            | 88,31        | 92,01        | 73,02        |
| 70                            | 63,90        | 71,36        | 56,63        | 70                            | 76,53        | 82,57        | 65,53        | 70                            | 88,50        | 92,15        | 73,13        |
| 65                            | 64,11        | 71,56        | 56,79        | 65                            | 76,74        | 82,75        | 65,67        | 65                            | 88,69        | 92,30        | 73,24        |
| 60                            | 64,33        | 71,76        | 56,94        | 60                            | 76,94        | 82,92        | 65,81        | 60                            | 88,88        | 92,44        | 73,36        |
| 55                            | 64,54        | 71,96        | 57,10        | 55                            | 77,15        | 83,10        | 65,94        | 55                            | 89,07        | 92,58        | 73,47        |
| <b>0,8850</b>                 | <b>64,75</b> | <b>72,15</b> | <b>57,26</b> | <b>0,8550</b>                 | <b>77,35</b> | <b>83,27</b> | <b>66,08</b> | <b>0,8250</b>                 | <b>89,26</b> | <b>92,72</b> | <b>73,58</b> |
| 45                            | 64,97        | 72,35        | 57,42        | 45                            | 77,56        | 83,44        | 66,22        | 45                            | 89,45        | 92,86        | 73,69        |
| 40                            | 65,18        | 72,55        | 57,57        | 40                            | 77,76        | 83,61        | 66,36        | 40                            | 89,64        | 93,00        | 73,80        |
| 35                            | 65,40        | 72,74        | 57,73        | 35                            | 77,97        | 83,78        | 66,49        | 35                            | 89,83        | 93,14        | 73,91        |
| 30                            | 65,61        | 72,94        | 57,88        | 30                            | 78,17        | 83,96        | 66,63        | 30                            | 90,02        | 93,28        | 74,02        |
| 25                            | 65,82        | 73,14        | 58,04        | 25                            | 78,38        | 84,13        | 66,76        | 25                            | 90,20        | 93,41        | 74,13        |
| 20                            | 66,04        | 73,33        | 58,19        | 20                            | 78,58        | 84,30        | 66,90        | 20                            | 90,39        | 93,55        | 74,24        |
| 15                            | 66,25        | 73,53        | 58,35        | 15                            | 78,79        | 84,47        | 67,03        | 15                            | 90,58        | 93,68        | 74,35        |
| 10                            | 66,46        | 73,72        | 58,50        | 10                            | 78,99        | 84,64        | 67,16        | 10                            | 90,76        | 93,82        | 74,45        |
| 05                            | 66,67        | 73,92        | 58,66        | 05                            | 79,20        | 84,80        | 67,30        | 05                            | 90,95        | 93,95        | 74,56        |
| <b>0,8800</b>                 | <b>66,89</b> | <b>74,11</b> | <b>58,81</b> | <b>0,8500</b>                 | <b>79,40</b> | <b>84,97</b> | <b>67,43</b> | <b>0,8200</b>                 | <b>91,13</b> | <b>94,09</b> | <b>74,66</b> |
| 0,8795                        | 67,10        | 74,30        | 58,96        | 0,8495                        | 79,60        | 85,14        | 67,57        | 0,8195                        | 91,32        | 94,22        | 74,77        |
| 90                            | 67,31        | 74,49        | 59,12        | 90                            | 79,81        | 85,31        | 67,70        | 90                            | 91,50        | 94,35        | 74,87        |
| 85                            | 67,52        | 74,69        | 59,27        | 85                            | 80,01        | 85,47        | 67,83        | 85                            | 91,68        | 94,48        | 74,98        |
| 80                            | 67,74        | 74,88        | 59,42        | 80                            | 80,21        | 85,64        | 67,96        | 80                            | 91,87        | 94,61        | 75,08        |
| 75                            | 67,95        | 75,07        | 59,57        | 75                            | 80,42        | 85,81        | 68,09        | 75                            | 92,05        | 94,75        | 75,19        |
| 70                            | 68,16        | 75,26        | 59,73        | 70                            | 80,62        | 85,97        | 68,23        | 70                            | 92,23        | 94,87        | 75,29        |
| 65                            | 68,37        | 75,45        | 59,88        | 65                            | 80,82        | 86,14        | 68,36        | 65                            | 92,41        | 95,00        | 75,39        |
| 60                            | 68,58        | 75,64        | 60,03        | 60                            | 81,02        | 86,30        | 68,49        | 60                            | 92,59        | 95,13        | 75,49        |
| 55                            | 68,80        | 75,84        | 60,18        | 55                            | 81,22        | 86,46        | 68,62        | 55                            | 92,77        | 95,26        | 75,59        |
| <b>0,8750</b>                 | <b>69,01</b> | <b>76,02</b> | <b>60,33</b> | <b>0,8450</b>                 | <b>81,43</b> | <b>86,63</b> | <b>68,75</b> | <b>0,8150</b>                 | <b>92,96</b> | <b>95,38</b> | <b>75,69</b> |
| 45                            | 69,22        | 76,21        | 60,48        | 45                            | 81,63        | 86,79        | 68,88        | 45                            | 93,13        | 95,51        | 75,79        |
| 40                            | 69,43        | 76,40        | 60,63        | 40                            | 81,83        | 86,95        | 69,00        | 40                            | 93,31        | 95,63        | 75,89        |
| 35                            | 69,64        | 76,59        | 60,78        | 35                            | 82,03        | 87,11        | 69,13        | 35                            | 93,49        | 95,76        | 75,99        |
| 30                            | 69,85        | 76,78        | 60,93        | 30                            | 82,23        | 87,28        | 69,26        | 30                            | 93,67        | 95,88        | 76,09        |
| 25                            | 70,06        | 76,97        | 61,08        | 25                            | 82,43        | 87,44        | 69,39        | 25                            | 93,85        | 96,00        | 76,19        |
| 20                            | 70,27        | 77,15        | 61,23        | 20                            | 82,63        | 87,60        | 69,52        | 20                            | 94,03        | 96,13        | 76,29        |
| 15                            | 70,48        | 77,34        | 61,38        | 15                            | 82,83        | 87,76        | 69,64        | 15                            | 94,20        | 96,25        | 76,38        |
| 10                            | 70,70        | 77,53        | 61,52        | 10                            | 83,03        | 87,92        | 69,77        | 10                            | 94,38        | 96,37        | 76,48        |
| 05                            | 70,91        | 77,71        | 61,67        | 05                            | 83,23        | 88,08        | 69,90        | 05                            | 94,55        | 96,49        | 76,57        |
| <b>0,8700</b>                 | <b>71,12</b> | <b>77,90</b> | <b>61,82</b> | <b>0,8400</b>                 | <b>83,43</b> | <b>88,23</b> | <b>70,02</b> | <b>0,8100</b>                 | <b>94,73</b> | <b>96,61</b> | <b>76,67</b> |
| 0,8695                        | 71,33        | 78,08        | 61,97        | 0,8395                        | 83,63        | 88,39        | 70,15        | 0,8095                        | 94,90        | 96,73        | 76,76        |
| 90                            | 71,54        | 78,27        | 62,11        | 90                            | 83,83        | 88,55        | 70,27        | 90                            | 95,08        | 96,85        | 76,86        |
| 85                            | 71,74        | 78,45        | 62,26        | 85                            | 84,03        | 88,71        | 70,40        | 85                            | 95,25        | 96,96        | 76,95        |
| 80                            | 71,95        | 78,64        | 62,40        | 80                            | 84,22        | 88,86        | 70,52        | 80                            | 95,43        | 97,08        | 77,04        |



| Scheinbare Dichte $d^{15}_{15}$ | Alkohol |         |              | Scheinbare Dichte $d^{15}_{15}$ | Alkohol |         |              | Scheinbare Dichte $d^{15}_{15}$ | Alkohol |         |              |
|---------------------------------|---------|---------|--------------|---------------------------------|---------|---------|--------------|---------------------------------|---------|---------|--------------|
|                                 | Gew.-%  | Raum.-% | g in 100 ccm |                                 | Gew.-%  | Raum.-% | g in 100 ccm |                                 | Gew.-%  | Raum.-% | g in 100 ccm |
| 0,8075                          | 95,60   | 97,19   | 77,13        | 25                              | 97,30   | 98,31   | 78,02        | 75                              | 98,95   | 99,36   | 78,85        |
| 70                              | 95,77   | 97,31   | 77,22        | 20                              | 97,47   | 98,42   | 78,10        | 70                              | 99,11   | 99,46   | 78,93        |
| 65                              | 95,94   | 97,42   | 77,31        | 15                              | 97,63   | 98,52   | 78,19        | 65                              | 99,28   | 99,56   | 79,01        |
| 60                              | 96,11   | 97,54   | 77,40        | 10                              | 97,80   | 98,63   | 78,27        | 60                              | 99,44   | 99,66   | 79,08        |
| 55                              | 96,29   | 97,65   | 77,49        | 05                              | 97,97   | 98,74   | 78,36        | 55                              | 99,60   | 99,76   | 79,16        |
|                                 |         |         |              |                                 |         |         |              | 50                              | 99,76   | 99,86   | 79,24        |
| 0,8050                          | 96,46   | 97,76   | 77,58        | 0,8000                          | 98,13   | 98,84   | 78,44        | 45                              | 99,92   | 99,95   | 79,32        |
| 45                              | 96,63   | 97,87   | 77,67        | 0,7995                          | 98,30   | 98,95   | 78,52        |                                 |         |         |              |
| 40                              | 96,79   | 97,99   | 77,76        | 90                              | 98,46   | 99,05   | 78,61        | 0,79425                         | 100,00  | 100,00  | 79,36        |
| 35                              | 96,96   | 98,09   | 77,85        | 85                              | 98,63   | 99,15   | 78,69        |                                 |         |         |              |
| 30                              | 97,13   | 98,20   | 77,93        | 80                              | 98,79   | 99,26   | 78,77        |                                 |         |         |              |

Tabelle VIII B. Bestimmung des Alkoholgehaltes von Alkohol-Wassermischungen aus der wahren Dichte bei 20° (vgl. S. 1010).

(Berechnet von J. GROSSFELD.)

| Dichte $d^{20}_4$ | Alkohol |         |              | Dichte $d^{20}_4$ | Alkohol |         |              | Dichte $d^{20}_4$ | Alkohol |         |              |
|-------------------|---------|---------|--------------|-------------------|---------|---------|--------------|-------------------|---------|---------|--------------|
|                   | Gew.-%  | Raum.-% | g in 1 Liter |                   | Gew.-%  | Raum.-% | g in 1 Liter |                   | Gew.-%  | Raum.-% | g in 1 Liter |
| 0,9989            | —       | —       | —            | 0,9959            | 1,28    | 1,61    | 12,7         | 0,9929            | 2,97    | 3,74    | 29,5         |
| 8                 | —       | —       | —            | 8                 | 1,33    | 1,68    | 13,3         | 8                 | 3,03    | 3,82    | 30,0         |
| 7                 | —       | —       | —            | 7                 | 1,37    | 1,75    | 13,8         | 7                 | 3,09    | 3,89    | 30,6         |
| 6                 | —       | —       | —            | 6                 | 1,44    | 1,82    | 14,4         | 6                 | 3,14    | 3,96    | 31,2         |
| 5                 | —       | —       | —            | 5                 | 1,50    | 1,89    | 14,9         | 5                 | 3,20    | 4,04    | 31,8         |
| 4                 | —       | —       | —            | 4                 | 1,55    | 1,96    | 15,4         | 4                 | 3,26    | 4,11    | 32,4         |
| 3                 | —       | —       | —            | 3                 | 1,61    | 2,03    | 16,0         | 3                 | 3,32    | 4,18    | 32,9         |
| 2                 | 0,04    | 0,05    | 0,4          | 2                 | 1,66    | 2,10    | 16,5         | 2                 | 3,38    | 4,25    | 33,5         |
| 1                 | 0,10    | 0,12    | 1,0          | 1                 | 1,72    | 2,17    | 17,1         | 1                 | 3,44    | 4,33    | 34,1         |
| 0                 | 0,15    | 0,19    | 1,5          | 0                 | 1,77    | 2,24    | 17,6         | 0                 | 3,50    | 4,40    | 34,7         |
| 0,9979            | 0,20    | 0,26    | 2,0          | 0,9949            | 1,83    | 2,31    | 18,2         | 0,9919            | 3,56    | 4,48    | 35,3         |
| 8                 | 0,26    | 0,32    | 2,6          | 8                 | 1,89    | 2,38    | 18,8         | 8                 | 3,62    | 4,55    | 35,9         |
| 7                 | 0,31    | 0,39    | 3,1          | 7                 | 1,94    | 2,45    | 19,3         | 7                 | 3,68    | 4,62    | 36,4         |
| 6                 | 0,36    | 0,46    | 3,6          | 6                 | 2,00    | 2,52    | 19,9         | 6                 | 3,74    | 4,70    | 37,0         |
| 5                 | 0,41    | 0,52    | 4,1          | 5                 | 2,06    | 2,59    | 20,4         | 5                 | 3,79    | 4,77    | 37,6         |
| 4                 | 0,47    | 0,59    | 4,7          | 4                 | 2,11    | 2,66    | 21,0         | 4                 | 3,85    | 4,85    | 38,2         |
| 3                 | 0,52    | 0,66    | 5,2          | 3                 | 2,17    | 2,73    | 21,5         | 3                 | 3,91    | 4,92    | 38,8         |
| 2                 | 0,57    | 0,73    | 5,7          | 2                 | 2,22    | 2,80    | 22,1         | 2                 | 3,97    | 4,99    | 39,4         |
| 1                 | 0,63    | 0,79    | 6,3          | 1                 | 2,28    | 2,88    | 22,7         | 1                 | 4,03    | 5,07    | 39,9         |
| 0                 | 0,68    | 0,86    | 6,8          | 0                 | 2,34    | 2,95    | 23,2         | 0                 | 4,09    | 5,14    | 40,6         |
| 0,9969            | 0,73    | 0,93    | 7,3          | 0,9939            | 2,39    | 3,02    | 23,9         | 0,9909            | 4,15    | 5,22    | 41,2         |
| 8                 | 0,79    | 1,00    | 7,9          | 8                 | 2,45    | 3,09    | 24,5         | 8                 | 4,21    | 5,29    | 41,8         |
| 7                 | 0,84    | 1,06    | 8,4          | 7                 | 2,51    | 3,16    | 25,0         | 7                 | 4,27    | 5,37    | 42,4         |
| 6                 | 0,90    | 1,13    | 8,9          | 6                 | 2,57    | 3,24    | 25,6         | 6                 | 4,34    | 5,44    | 43,0         |
| 5                 | 0,95    | 1,20    | 9,5          | 5                 | 2,62    | 3,31    | 26,2         | 5                 | 4,40    | 5,52    | 43,6         |
| 4                 | 1,00    | 1,27    | 10,0         | 4                 | 2,68    | 3,38    | 26,7         | 4                 | 4,46    | 5,59    | 44,1         |
| 3                 | 1,06    | 1,34    | 10,5         | 3                 | 2,74    | 3,45    | 27,3         | 3                 | 4,52    | 5,67    | 44,7         |
| 2                 | 1,11    | 1,40    | 11,1         | 2                 | 2,79    | 3,52    | 27,9         | 2                 | 4,58    | 5,75    | 45,3         |
| 1                 | 1,17    | 1,47    | 11,6         | 1                 | 2,85    | 3,60    | 28,4         | 1                 | 4,64    | 5,82    | 45,9         |
| 0                 | 1,22    | 1,54    | 12,2         | 0                 | 2,91    | 3,67    | 28,9         | 0                 | 4,70    | 5,90    | 46,5         |

Tabelle VIII B. Bestimmung des Alkohols aus  $d^{20}_4$ .

| Dichte<br>$d^{20}_4$ | Alkohol     |             |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Alkohol      |              |                 |
|----------------------|-------------|-------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                      | Gew.-<br>%  | Raum-<br>%  | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |
| <b>0,9899</b>        | <b>4,76</b> | <b>5,97</b> | <b>47,1</b>     | <b>0,9839</b>        | <b>8,67</b>  | <b>10,80</b> | <b>85,2</b>     | <b>0,9779</b>        | <b>13,05</b> | <b>16,16</b> | <b>127,7</b>    |
| 8                    | 4,82        | 6,05        | 47,8            | 8                    | 8,74         | 10,89        | 85,9            | 8                    | 13,12        | 16,25        | 128,4           |
| 7                    | 4,89        | 6,13        | 48,4            | 7                    | 8,81         | 10,97        | 86,6            | 7                    | 13,20        | 16,34        | 129,1           |
| 6                    | 4,95        | 6,20        | 49,0            | 6                    | 8,88         | 11,06        | 87,2            | 6                    | 13,28        | 16,43        | 129,9           |
| 5                    | 5,01        | 6,28        | 49,6            | 5                    | 8,95         | 11,15        | 87,9            | 5                    | 13,35        | 16,53        | 130,6           |
| 4                    | 5,07        | 6,36        | 50,2            | 4                    | 9,02         | 11,23        | 88,6            | 4                    | 13,43        | 16,62        | 131,3           |
| 3                    | 5,13        | 6,43        | 50,8            | 3                    | 9,09         | 11,32        | 89,2            | 3                    | 13,50        | 16,71        | 132,1           |
| 2                    | 5,20        | 6,51        | 51,4            | 2                    | 9,16         | 11,40        | 89,9            | 2                    | 13,58        | 16,80        | 132,8           |
| 1                    | 5,26        | 6,59        | 52,0            | 1                    | 9,23         | 11,49        | 90,6            | 1                    | 13,66        | 16,89        | 133,5           |
| 0                    | 5,32        | 6,66        | 52,6            | 0                    | 9,30         | 11,57        | 91,3            | 0                    | 13,73        | 16,99        | 134,3           |
| <b>0,9889</b>        | <b>5,38</b> | <b>6,74</b> | <b>53,2</b>     | <b>0,9829</b>        | <b>9,37</b>  | <b>11,66</b> | <b>91,9</b>     | <b>0,9769</b>        | <b>13,81</b> | <b>17,08</b> | <b>135,0</b>    |
| 8                    | 5,44        | 6,82        | 53,8            | 8                    | 9,44         | 11,75        | 92,6            | 8                    | 13,89        | 17,18        | 135,7           |
| 7                    | 5,51        | 6,90        | 54,5            | 7                    | 9,51         | 11,84        | 93,3            | 7                    | 13,96        | 17,27        | 136,5           |
| 6                    | 5,57        | 6,98        | 55,1            | 6                    | 9,58         | 11,92        | 94,0            | 6                    | 14,04        | 17,36        | 137,2           |
| 5                    | 5,63        | 7,05        | 55,7            | 5                    | 9,66         | 12,01        | 94,7            | 5                    | 14,12        | 17,46        | 137,9           |
| 4                    | 5,69        | 7,13        | 56,3            | 4                    | 9,73         | 12,10        | 95,4            | 4                    | 14,20        | 17,55        | 138,7           |
| 3                    | 5,76        | 7,21        | 56,9            | 3                    | 9,80         | 12,18        | 96,0            | 3                    | 14,27        | 17,64        | 139,4           |
| 2                    | 5,82        | 7,29        | 57,6            | 2                    | 9,87         | 12,27        | 96,7            | 2                    | 14,35        | 17,74        | 140,1           |
| 1                    | 5,88        | 7,37        | 58,2            | 1                    | 9,94         | 12,36        | 97,4            | 1                    | 14,42        | 17,83        | 140,9           |
| 0                    | 5,94        | 7,44        | 58,8            | 0                    | 10,01        | 12,45        | 98,1            | 0                    | 14,50        | 17,92        | 141,6           |
| <b>0,9879</b>        | <b>6,01</b> | <b>7,52</b> | <b>59,4</b>     | <b>0,9819</b>        | <b>10,08</b> | <b>12,53</b> | <b>98,8</b>     | <b>0,9759</b>        | <b>14,58</b> | <b>18,02</b> | <b>142,3</b>    |
| 8                    | 6,07        | 7,60        | 60,1            | 8                    | 10,15        | 12,62        | 99,5            | 8                    | 14,66        | 18,11        | 143,1           |
| 7                    | 6,14        | 7,68        | 60,7            | 7                    | 10,22        | 12,71        | 100,2           | 7                    | 14,74        | 18,21        | 143,8           |
| 6                    | 6,20        | 7,76        | 61,3            | 6                    | 10,29        | 12,80        | 100,9           | 6                    | 14,81        | 18,30        | 144,5           |
| 5                    | 6,27        | 7,84        | 61,9            | 5                    | 10,37        | 12,89        | 101,7           | 5                    | 14,89        | 18,40        | 145,3           |
| 4                    | 6,33        | 7,92        | 62,6            | 4                    | 10,44        | 12,98        | 102,4           | 4                    | 14,97        | 18,49        | 146,0           |
| 3                    | 6,40        | 8,00        | 63,2            | 3                    | 10,51        | 13,07        | 103,1           | 3                    | 15,05        | 18,58        | 146,7           |
| 2                    | 6,46        | 8,08        | 63,8            | 2                    | 10,59        | 13,16        | 103,8           | 2                    | 15,12        | 18,68        | 147,5           |
| 1                    | 6,53        | 8,16        | 64,5            | 1                    | 10,66        | 13,24        | 104,5           | 1                    | 15,20        | 18,77        | 148,2           |
| 0                    | 6,59        | 8,24        | 65,1            | 0                    | 10,73        | 13,33        | 105,2           | 0                    | 15,28        | 18,87        | 149,0           |
| <b>0,9869</b>        | <b>6,66</b> | <b>8,32</b> | <b>65,7</b>     | <b>0,9809</b>        | <b>10,81</b> | <b>13,42</b> | <b>105,9</b>    | <b>0,9749</b>        | <b>15,35</b> | <b>18,96</b> | <b>149,7</b>    |
| 8                    | 6,72        | 8,40        | 66,4            | 8                    | 10,88        | 13,51        | 106,6           | 8                    | 15,43        | 19,06        | 150,4           |
| 7                    | 6,79        | 8,48        | 67,0            | 7                    | 10,95        | 13,60        | 107,3           | 7                    | 15,51        | 19,15        | 151,1           |
| 6                    | 6,85        | 8,56        | 67,6            | 6                    | 11,03        | 13,69        | 108,1           | 6                    | 15,59        | 19,24        | 151,9           |
| 5                    | 6,92        | 8,64        | 68,3            | 5                    | 11,10        | 13,78        | 108,8           | 5                    | 15,67        | 19,34        | 152,6           |
| 4                    | 6,98        | 8,72        | 68,9            | 4                    | 11,17        | 13,87        | 109,5           | 4                    | 15,74        | 19,43        | 153,3           |
| 3                    | 7,05        | 8,81        | 69,5            | 3                    | 11,25        | 13,96        | 110,2           | 3                    | 15,82        | 19,52        | 154,1           |
| 2                    | 7,12        | 8,89        | 70,2            | 2                    | 11,32        | 14,05        | 110,9           | 2                    | 15,90        | 19,62        | 154,8           |
| 1                    | 7,18        | 8,97        | 70,8            | 1                    | 11,39        | 14,14        | 111,7           | 1                    | 15,98        | 19,71        | 155,5           |
| 0                    | 7,25        | 9,05        | 71,5            | 0                    | 11,47        | 14,24        | 112,4           | 0                    | 16,05        | 19,81        | 156,3           |
| <b>0,9859</b>        | <b>7,31</b> | <b>9,13</b> | <b>72,1</b>     | <b>0,9799</b>        | <b>11,54</b> | <b>14,33</b> | <b>113,1</b>    | <b>0,9739</b>        | <b>16,13</b> | <b>19,90</b> | <b>157,0</b>    |
| 8                    | 7,38        | 9,21        | 72,8            | 8                    | 11,62        | 14,42        | 113,8           | 8                    | 16,21        | 19,99        | 157,7           |
| 7                    | 7,44        | 9,30        | 73,4            | 7                    | 11,69        | 14,51        | 114,6           | 7                    | 16,28        | 20,09        | 158,4           |
| 6                    | 7,51        | 9,38        | 74,1            | 6                    | 11,77        | 14,60        | 115,3           | 6                    | 16,36        | 20,18        | 159,2           |
| 5                    | 7,58        | 9,46        | 74,7            | 5                    | 11,84        | 14,69        | 116,0           | 5                    | 16,44        | 20,27        | 159,9           |
| 4                    | 7,65        | 9,54        | 75,4            | 4                    | 11,91        | 14,78        | 116,7           | 4                    | 16,52        | 20,36        | 160,6           |
| 3                    | 7,71        | 9,63        | 76,0            | 3                    | 11,99        | 14,87        | 117,5           | 3                    | 16,59        | 20,46        | 161,4           |
| 2                    | 7,78        | 9,71        | 76,7            | 2                    | 12,06        | 14,96        | 118,2           | 2                    | 16,67        | 20,55        | 162,1           |
| 1                    | 7,84        | 9,79        | 77,3            | 1                    | 12,14        | 15,05        | 118,9           | 1                    | 16,75        | 20,64        | 162,8           |
| 0                    | 7,91        | 9,88        | 78,0            | 0                    | 12,21        | 15,15        | 119,6           | 0                    | 16,82        | 20,74        | 163,5           |
| <b>0,9849</b>        | <b>7,98</b> | <b>9,96</b> | <b>78,6</b>     | <b>0,9789</b>        | <b>12,29</b> | <b>15,24</b> | <b>120,4</b>    | <b>0,9729</b>        | <b>16,90</b> | <b>20,83</b> | <b>164,3</b>    |
| 8                    | 8,05        | 10,04       | 79,3            | 8                    | 12,36        | 15,33        | 121,1           | 8                    | 16,98        | 20,92        | 165,0           |
| 7                    | 8,12        | 10,13       | 79,9            | 7                    | 12,44        | 15,42        | 121,8           | 7                    | 17,05        | 21,01        | 165,7           |
| 6                    | 8,19        | 10,21       | 80,6            | 6                    | 12,52        | 15,51        | 122,6           | 6                    | 17,13        | 21,11        | 166,5           |
| 5                    | 8,26        | 10,30       | 81,3            | 5                    | 12,59        | 15,60        | 123,3           | 5                    | 17,21        | 21,20        | 167,2           |
| 4                    | 8,33        | 10,38       | 81,9            | 4                    | 12,67        | 15,70        | 124,0           | 4                    | 17,28        | 21,29        | 167,9           |
| 3                    | 8,40        | 10,46       | 82,6            | 3                    | 12,74        | 15,79        | 124,7           | 3                    | 17,36        | 21,38        | 168,6           |
| 2                    | 8,47        | 10,55       | 83,2            | 2                    | 12,82        | 15,88        | 125,5           | 2                    | 17,44        | 21,48        | 169,4           |
| 1                    | 8,54        | 10,63       | 83,9            | 1                    | 12,89        | 15,97        | 126,2           | 1                    | 17,52        | 21,57        | 170,1           |
| 0                    | 8,60        | 10,72       | 84,6            | 0                    | 12,97        | 16,06        | 126,9           | 0                    | 17,59        | 21,66        | 170,8           |

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |
| <b>0,9719</b>        | <b>17,67</b> | <b>21,75</b> | <b>171,6</b>    | <b>0,9659</b>        | <b>22,11</b> | <b>27,06</b> | <b>213,7</b>    | <b>0,9599</b>        | <b>26,21</b> | <b>31,87</b> | <b>251,6</b>    |
| 8                    | 17,74        | 21,84        | 172,3           | 8                    | 22,18        | 27,14        | 214,3           | 8                    | 26,28        | 31,95        | 252,2           |
| 7                    | 17,82        | 21,94        | 173,0           | 7                    | 22,26        | 27,23        | 215,0           | 7                    | 26,34        | 32,03        | 252,8           |
| 6                    | 17,90        | 22,03        | 173,7           | 6                    | 22,33        | 27,31        | 215,6           | 6                    | 26,41        | 32,10        | 253,4           |
| 5                    | 17,97        | 22,12        | 174,5           | 5                    | 22,40        | 27,39        | 216,3           | 5                    | 26,47        | 32,18        | 254,0           |
| 4                    | 18,05        | 22,21        | 175,2           | 4                    | 22,47        | 27,48        | 217,0           | 4                    | 26,53        | 32,25        | 254,6           |
| 3                    | 18,13        | 22,30        | 175,9           | 3                    | 22,54        | 27,56        | 217,6           | 3                    | 26,60        | 32,33        | 255,2           |
| 2                    | 18,20        | 22,39        | 176,7           | 2                    | 22,61        | 27,65        | 218,3           | 2                    | 26,67        | 32,40        | 255,7           |
| 1                    | 18,28        | 22,49        | 177,4           | 1                    | 22,68        | 27,73        | 218,9           | 1                    | 26,70        | 32,48        | 256,4           |
| 0                    | 18,36        | 22,58        | 178,1           | 0                    | 22,75        | 27,81        | 219,6           | 0                    | 26,80        | 32,56        | 257,0           |
| <b>0,9709</b>        | <b>18,43</b> | <b>22,67</b> | <b>178,8</b>    | <b>0,9649</b>        | <b>22,82</b> | <b>27,90</b> | <b>220,2</b>    | <b>0,9589</b>        | <b>26,86</b> | <b>32,63</b> | <b>257,6</b>    |
| 8                    | 18,51        | 22,76        | 179,6           | 8                    | 22,89        | 27,98        | 220,9           | 8                    | 26,93        | 32,70        | 258,1           |
| 7                    | 18,58        | 22,85        | 180,3           | 7                    | 22,96        | 28,06        | 221,5           | 7                    | 27,00        | 32,78        | 258,7           |
| 6                    | 18,66        | 22,94        | 181,0           | 6                    | 23,03        | 28,14        | 222,2           | 6                    | 27,06        | 32,85        | 259,3           |
| 5                    | 18,73        | 23,03        | 181,8           | 5                    | 23,10        | 28,23        | 222,8           | 5                    | 27,12        | 32,93        | 259,9           |
| 4                    | 18,81        | 23,12        | 182,5           | 4                    | 23,17        | 28,31        | 223,5           | 4                    | 27,18        | 33,00        | 260,5           |
| 3                    | 18,89        | 23,21        | 183,2           | 3                    | 23,24        | 28,39        | 224,1           | 3                    | 27,25        | 33,08        | 261,0           |
| 2                    | 18,96        | 23,30        | 183,9           | 2                    | 23,31        | 28,47        | 224,8           | 2                    | 27,31        | 33,16        | 261,6           |
| 1                    | 19,04        | 23,39        | 184,7           | 1                    | 23,38        | 28,56        | 225,4           | 1                    | 27,38        | 33,22        | 262,2           |
| 0                    | 19,11        | 23,48        | 185,4           | 0                    | 23,45        | 28,64        | 226,1           | 0                    | 27,44        | 33,30        | 262,8           |
| <b>0,9699</b>        | <b>19,19</b> | <b>23,57</b> | <b>186,1</b>    | <b>0,9639</b>        | <b>23,52</b> | <b>28,72</b> | <b>226,7</b>    | <b>0,9579</b>        | <b>27,50</b> | <b>33,37</b> | <b>263,4</b>    |
| 8                    | 19,26        | 23,66        | 186,8           | 8                    | 23,59        | 28,80        | 227,3           | 8                    | 27,56        | 33,44        | 263,9           |
| 7                    | 19,34        | 23,75        | 187,5           | 7                    | 23,66        | 28,88        | 228,0           | 7                    | 27,63        | 33,52        | 264,5           |
| 6                    | 19,41        | 23,84        | 188,2           | 6                    | 23,73        | 28,96        | 228,6           | 6                    | 27,69        | 33,59        | 265,1           |
| 5                    | 19,49        | 23,93        | 188,9           | 5                    | 23,80        | 29,04        | 229,3           | 5                    | 27,75        | 33,66        | 265,7           |
| 4                    | 19,56        | 24,02        | 189,7           | 4                    | 23,87        | 29,12        | 229,9           | 4                    | 27,82        | 33,73        | 266,3           |
| 3                    | 19,63        | 24,11        | 190,4           | 3                    | 23,94        | 29,21        | 230,5           | 3                    | 27,88        | 33,81        | 266,8           |
| 2                    | 19,71        | 24,20        | 191,1           | 2                    | 24,00        | 29,29        | 231,2           | 2                    | 27,94        | 33,88        | 267,4           |
| 1                    | 19,78        | 24,29        | 191,8           | 1                    | 24,07        | 29,37        | 231,8           | 1                    | 28,00        | 33,95        | 267,9           |
| 0                    | 19,86        | 24,38        | 192,5           | 0                    | 24,14        | 29,45        | 232,5           | 0                    | 28,07        | 34,03        | 268,6           |
| <b>0,9689</b>        | <b>19,93</b> | <b>24,47</b> | <b>193,2</b>    | <b>0,9629</b>        | <b>24,21</b> | <b>29,53</b> | <b>233,1</b>    | <b>0,9569</b>        | <b>28,13</b> | <b>34,10</b> | <b>269,1</b>    |
| 8                    | 20,01        | 24,55        | 193,9           | 8                    | 24,28        | 29,61        | 233,7           | 8                    | 28,19        | 34,17        | 269,7           |
| 7                    | 20,08        | 24,64        | 194,6           | 7                    | 24,35        | 29,69        | 234,4           | 7                    | 28,25        | 34,24        | 270,3           |
| 6                    | 20,15        | 24,73        | 195,3           | 6                    | 24,42        | 29,77        | 235,0           | 6                    | 28,31        | 34,31        | 270,8           |
| 5                    | 20,23        | 24,82        | 196,0           | 5                    | 24,48        | 29,85        | 235,6           | 5                    | 28,38        | 34,38        | 271,4           |
| 4                    | 20,30        | 24,91        | 196,7           | 4                    | 24,55        | 29,93        | 236,2           | 4                    | 28,44        | 34,45        | 272,0           |
| 3                    | 20,37        | 24,99        | 197,4           | 3                    | 24,62        | 30,01        | 236,9           | 3                    | 28,50        | 34,52        | 272,5           |
| 2                    | 20,45        | 25,08        | 198,1           | 2                    | 24,69        | 30,09        | 237,5           | 2                    | 28,56        | 34,60        | 273,1           |
| 1                    | 20,52        | 25,17        | 198,8           | 1                    | 24,76        | 30,17        | 238,1           | 1                    | 28,62        | 34,67        | 273,7           |
| 0                    | 20,60        | 25,26        | 199,5           | 0                    | 24,82        | 30,25        | 238,8           | 0                    | 28,68        | 34,74        | 274,2           |
| <b>0,9679</b>        | <b>20,67</b> | <b>25,34</b> | <b>200,2</b>    | <b>0,9619</b>        | <b>24,89</b> | <b>30,32</b> | <b>239,4</b>    | <b>0,9559</b>        | <b>28,75</b> | <b>34,81</b> | <b>274,8</b>    |
| 8                    | 20,74        | 25,43        | 200,9           | 8                    | 24,96        | 30,40        | 240,0           | 8                    | 28,81        | 34,88        | 275,3           |
| 7                    | 20,81        | 25,52        | 201,5           | 7                    | 25,02        | 30,48        | 240,6           | 7                    | 28,87        | 34,95        | 275,9           |
| 6                    | 20,89        | 25,60        | 202,2           | 6                    | 25,09        | 30,56        | 241,2           | 6                    | 28,93        | 35,02        | 276,4           |
| 5                    | 20,96        | 25,69        | 202,9           | 5                    | 25,16        | 30,64        | 241,9           | 5                    | 28,99        | 35,09        | 277,0           |
| 4                    | 21,03        | 25,78        | 203,6           | 4                    | 25,22        | 30,72        | 242,5           | 4                    | 29,05        | 35,16        | 277,6           |
| 3                    | 21,11        | 25,86        | 204,3           | 3                    | 25,29        | 30,79        | 243,1           | 3                    | 29,11        | 35,23        | 278,1           |
| 2                    | 21,18        | 25,95        | 205,0           | 2                    | 25,36        | 30,87        | 243,7           | 2                    | 29,17        | 35,30        | 278,7           |
| 1                    | 21,25        | 26,04        | 205,7           | 1                    | 25,42        | 30,95        | 244,3           | 1                    | 29,24        | 35,37        | 279,2           |
| 0                    | 21,32        | 26,12        | 206,3           | 0                    | 25,49        | 31,03        | 245,0           | 0                    | 29,30        | 35,44        | 279,8           |
| <b>0,9669</b>        | <b>21,40</b> | <b>26,21</b> | <b>207,0</b>    | <b>0,9609</b>        | <b>25,56</b> | <b>31,11</b> | <b>245,6</b>    | <b>0,9549</b>        | <b>29,36</b> | <b>35,51</b> | <b>280,3</b>    |
| 8                    | 21,47        | 26,29        | 207,7           | 8                    | 25,62        | 31,18        | 246,2           | 8                    | 29,42        | 35,58        | 280,9           |
| 7                    | 21,54        | 26,38        | 208,4           | 7                    | 25,69        | 31,26        | 246,8           | 7                    | 29,48        | 35,65        | 281,4           |
| 6                    | 21,61        | 26,46        | 209,0           | 6                    | 25,75        | 31,34        | 247,4           | 6                    | 29,54        | 35,72        | 282,0           |
| 5                    | 21,68        | 26,55        | 209,7           | 5                    | 25,82        | 31,41        | 248,0           | 5                    | 29,60        | 35,79        | 282,5           |
| 4                    | 21,76        | 26,63        | 210,4           | 4                    | 25,89        | 31,49        | 248,6           | 4                    | 29,66        | 35,86        | 283,0           |
| 3                    | 21,83        | 26,72        | 211,0           | 3                    | 25,95        | 31,57        | 249,2           | 3                    | 29,72        | 35,93        | 283,4           |
| 2                    | 21,90        | 26,80        | 211,7           | 2                    | 26,02        | 31,65        | 249,8           | 2                    | 29,78        | 36,00        | 284,1           |
| 1                    | 21,97        | 26,89        | 212,4           | 1                    | 26,08        | 31,72        | 250,4           | 1                    | 29,84        | 36,06        | 284,7           |
| 0                    | 22,04        | 26,97        | 213,0           | 0                    | 26,15        | 31,80        | 251,0           | 0                    | 29,90        | 36,13        | 285,2           |

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |
| <b>0,9539</b>        | <b>29,96</b> | <b>36,20</b> | <b>285,7</b>    | <b>0,9479</b>        | <b>33,41</b> | <b>40,12</b> | <b>316,9</b>    | <b>0,9419</b>        | <b>36,62</b> | <b>43,70</b> | <b>344,9</b>    |
| 8                    | 30,02        | 36,27        | 286,3           | 8                    | 33,47        | 40,18        | 317,4           | 8                    | 36,68        | 43,76        | 345,4           |
| 7                    | 30,08        | 36,34        | 286,8           | 7                    | 33,53        | 40,24        | 317,8           | 7                    | 36,74        | 43,82        | 345,8           |
| 6                    | 30,14        | 36,41        | 287,3           | 6                    | 33,58        | 40,31        | 318,3           | 6                    | 36,79        | 43,88        | 346,3           |
| 5                    | 30,20        | 36,48        | 287,9           | 5                    | 33,63        | 40,37        | 318,8           | 5                    | 36,84        | 43,94        | 346,8           |
| 4                    | 30,26        | 36,54        | 288,4           | 4                    | 33,69        | 40,43        | 319,3           | 4                    | 36,89        | 43,99        | 347,2           |
| 3                    | 30,32        | 36,61        | 288,9           | 3                    | 33,75        | 40,49        | 319,8           | 3                    | 36,95        | 44,05        | 347,7           |
| 2                    | 30,38        | 36,68        | 289,5           | 2                    | 33,80        | 40,55        | 320,3           | 2                    | 37,00        | 44,11        | 348,1           |
| 1                    | 30,44        | 36,75        | 290,0           | 1                    | 33,86        | 40,61        | 320,8           | 1                    | 37,05        | 44,17        | 348,6           |
| 0                    | 30,50        | 36,82        | 290,5           | 0                    | 33,91        | 40,68        | 321,3           | 0                    | 37,10        | 44,22        | 349,0           |
| <b>0,9529</b>        | <b>30,56</b> | <b>36,88</b> | <b>291,1</b>    | <b>0,9469</b>        | <b>33,97</b> | <b>40,74</b> | <b>321,7</b>    | <b>0,9409</b>        | <b>37,15</b> | <b>44,28</b> | <b>349,5</b>    |
| 8                    | 30,62        | 36,95        | 291,6           | 8                    | 34,02        | 40,80        | 322,2           | 8                    | 37,21        | 44,34        | 350,0           |
| 7                    | 30,68        | 37,02        | 292,1           | 7                    | 34,07        | 40,86        | 322,7           | 7                    | 37,26        | 44,39        | 350,4           |
| 6                    | 30,74        | 37,09        | 292,7           | 6                    | 34,13        | 40,92        | 323,2           | 6                    | 37,31        | 44,45        | 350,9           |
| 5                    | 30,80        | 37,15        | 293,2           | 5                    | 34,18        | 40,98        | 323,6           | 5                    | 37,36        | 44,51        | 351,3           |
| 4                    | 30,86        | 37,22        | 293,7           | 4                    | 34,24        | 41,04        | 324,1           | 4                    | 37,41        | 44,57        | 351,8           |
| 3                    | 30,92        | 37,29        | 294,2           | 3                    | 34,29        | 41,10        | 324,6           | 3                    | 37,46        | 44,62        | 352,2           |
| 2                    | 30,97        | 37,35        | 294,8           | 2                    | 34,35        | 41,16        | 325,1           | 2                    | 37,52        | 44,68        | 352,7           |
| 1                    | 31,03        | 37,42        | 295,3           | 1                    | 34,40        | 41,22        | 325,5           | 1                    | 37,57        | 44,74        | 353,1           |
| 0                    | 31,09        | 37,49        | 295,8           | 0                    | 34,45        | 41,28        | 326,0           | 0                    | 37,62        | 44,80        | 353,6           |
| <b>0,9519</b>        | <b>31,15</b> | <b>37,55</b> | <b>296,3</b>    | <b>0,9459</b>        | <b>34,51</b> | <b>41,34</b> | <b>326,5</b>    | <b>0,9399</b>        | <b>37,67</b> | <b>44,85</b> | <b>354,1</b>    |
| 8                    | 31,21        | 37,62        | 296,9           | 8                    | 34,56        | 41,40        | 326,9           | 8                    | 37,72        | 44,91        | 354,5           |
| 7                    | 31,27        | 37,69        | 297,4           | 7                    | 34,61        | 41,46        | 327,4           | 7                    | 37,77        | 44,96        | 355,1           |
| 6                    | 31,32        | 37,75        | 297,9           | 6                    | 34,67        | 41,52        | 327,9           | 6                    | 37,82        | 45,02        | 355,4           |
| 5                    | 31,38        | 37,82        | 298,4           | 5                    | 34,72        | 41,58        | 328,3           | 5                    | 37,88        | 45,08        | 355,9           |
| 4                    | 31,44        | 37,88        | 299,0           | 4                    | 34,77        | 41,64        | 328,8           | 4                    | 37,93        | 45,13        | 356,3           |
| 3                    | 31,50        | 37,95        | 299,5           | 3                    | 34,83        | 41,70        | 329,3           | 3                    | 37,98        | 45,19        | 356,8           |
| 2                    | 31,56        | 38,02        | 300,0           | 2                    | 34,88        | 41,76        | 329,7           | 2                    | 38,03        | 45,25        | 357,2           |
| 1                    | 31,61        | 38,08        | 300,5           | 1                    | 34,93        | 41,82        | 330,2           | 1                    | 38,08        | 45,30        | 357,7           |
| 0                    | 31,67        | 38,15        | 301,0           | 0                    | 34,99        | 41,89        | 330,7           | 0                    | 38,13        | 45,36        | 358,1           |
| <b>0,9509</b>        | <b>31,73</b> | <b>38,21</b> | <b>301,6</b>    | <b>0,9449</b>        | <b>35,04</b> | <b>41,94</b> | <b>331,1</b>    | <b>0,9389</b>        | <b>38,18</b> | <b>45,41</b> | <b>358,5</b>    |
| 8                    | 31,78        | 38,28        | 302,1           | 8                    | 35,10        | 42,00        | 331,6           | 8                    | 38,23        | 45,47        | 359,0           |
| 7                    | 31,84        | 38,34        | 302,6           | 7                    | 35,15        | 42,06        | 332,0           | 7                    | 38,28        | 45,53        | 359,4           |
| 6                    | 31,90        | 38,41        | 303,1           | 6                    | 35,20        | 42,12        | 332,5           | 6                    | 38,33        | 45,58        | 359,9           |
| 5                    | 31,95        | 38,47        | 303,6           | 5                    | 35,26        | 42,18        | 333,0           | 5                    | 38,38        | 45,64        | 360,3           |
| 4                    | 32,01        | 38,54        | 304,2           | 4                    | 35,31        | 42,24        | 333,4           | 4                    | 38,43        | 45,69        | 360,7           |
| 3                    | 32,07        | 38,60        | 304,7           | 3                    | 35,36        | 42,30        | 333,9           | 3                    | 38,48        | 45,75        | 361,2           |
| 2                    | 32,12        | 38,67        | 305,2           | 2                    | 35,42        | 42,36        | 334,3           | 2                    | 38,53        | 45,80        | 361,6           |
| 1                    | 32,18        | 38,73        | 305,7           | 1                    | 35,47        | 42,42        | 334,8           | 1                    | 38,58        | 45,86        | 362,1           |
| 0                    | 32,24        | 38,80        | 306,3           | 0                    | 35,52        | 42,48        | 335,3           | 0                    | 38,64        | 45,92        | 362,5           |
| <b>0,9499</b>        | <b>32,29</b> | <b>38,86</b> | <b>306,8</b>    | <b>0,9439</b>        | <b>35,57</b> | <b>42,54</b> | <b>335,7</b>    | <b>0,9379</b>        | <b>38,68</b> | <b>45,97</b> | <b>362,9</b>    |
| 8                    | 32,35        | 38,92        | 307,3           | 8                    | 35,63        | 42,60        | 336,2           | 8                    | 38,73        | 46,02        | 363,4           |
| 7                    | 32,41        | 38,99        | 307,8           | 7                    | 35,68        | 42,66        | 336,6           | 7                    | 38,78        | 46,08        | 363,8           |
| 6                    | 32,46        | 39,05        | 308,3           | 6                    | 35,73        | 42,71        | 337,1           | 6                    | 38,83        | 46,13        | 364,2           |
| 5                    | 32,52        | 39,11        | 308,8           | 5                    | 35,79        | 42,77        | 337,6           | 5                    | 38,88        | 46,19        | 364,7           |
| 4                    | 32,58        | 39,18        | 309,3           | 4                    | 35,84        | 42,83        | 338,0           | 4                    | 38,93        | 46,24        | 365,1           |
| 3                    | 32,63        | 39,24        | 309,8           | 3                    | 35,89        | 42,89        | 338,5           | 3                    | 38,98        | 46,30        | 365,5           |
| 2                    | 32,69        | 39,30        | 310,3           | 2                    | 35,95        | 42,95        | 339,0           | 2                    | 39,03        | 46,35        | 365,9           |
| 1                    | 32,75        | 39,37        | 310,8           | 1                    | 36,00        | 43,01        | 339,4           | 1                    | 39,08        | 46,41        | 366,4           |
| 0                    | 32,80        | 39,43        | 311,4           | 0                    | 36,05        | 43,07        | 339,9           | 0                    | 39,13        | 46,46        | 366,8           |
| <b>0,9489</b>        | <b>32,86</b> | <b>39,49</b> | <b>311,9</b>    | <b>0,9429</b>        | <b>36,10</b> | <b>43,13</b> | <b>340,3</b>    | <b>0,9369</b>        | <b>39,18</b> | <b>46,52</b> | <b>367,2</b>    |
| 8                    | 32,91        | 39,56        | 312,4           | 8                    | 36,16        | 43,18        | 340,8           | 8                    | 39,23        | 46,57        | 367,6           |
| 7                    | 32,97        | 39,62        | 312,9           | 7                    | 36,21        | 43,24        | 341,3           | 7                    | 39,28        | 46,62        | 368,1           |
| 6                    | 33,02        | 39,68        | 313,4           | 6                    | 36,26        | 43,30        | 341,7           | 6                    | 39,33        | 46,68        | 368,5           |
| 5                    | 33,08        | 39,75        | 313,9           | 5                    | 36,31        | 43,36        | 342,2           | 5                    | 39,38        | 46,73        | 368,9           |
| 4                    | 33,14        | 39,81        | 314,4           | 4                    | 36,37        | 43,42        | 342,6           | 4                    | 39,43        | 46,79        | 369,3           |
| 3                    | 33,19        | 39,87        | 314,9           | 3                    | 36,42        | 43,47        | 343,1           | 3                    | 39,48        | 46,84        | 369,8           |
| 2                    | 33,25        | 39,93        | 315,4           | 2                    | 36,47        | 43,53        | 343,6           | 2                    | 39,53        | 46,89        | 370,2           |
| 1                    | 33,30        | 40,00        | 315,9           | 1                    | 36,53        | 43,59        | 344,0           | 1                    | 39,58        | 46,95        | 370,6           |
| 0                    | 33,36        | 40,06        | 316,4           | 0                    | 36,58        | 43,65        | 344,5           | 0                    | 39,63        | 47,00        | 371,1           |

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |
| <b>0,9359</b>        | <b>39,68</b> | <b>47,06</b> | <b>371,5</b>    | <b>0,9299</b>        | <b>42,62</b> | <b>50,20</b> | <b>396,3</b>    | <b>0,9239</b>        | <b>45,45</b> | <b>53,19</b> | <b>420,0</b>    |
| 8                    | 39,73        | 47,11        | 371,9           | 8                    | 42,66        | 50,25        | 396,7           | 8                    | 45,50        | 53,24        | 420,3           |
| 7                    | 39,78        | 47,16        | 372,3           | 7                    | 42,71        | 50,30        | 397,1           | 7                    | 45,55        | 53,29        | 420,7           |
| 6                    | 39,83        | 47,21        | 372,7           | 6                    | 42,76        | 50,35        | 397,5           | 6                    | 45,59        | 53,34        | 421,1           |
| 5                    | 39,88        | 47,27        | 373,1           | 5                    | 42,81        | 50,41        | 397,9           | 5                    | 45,64        | 53,39        | 421,5           |
| 4                    | 39,93        | 47,32        | 373,5           | 4                    | 42,86        | 50,46        | 398,3           | 4                    | 45,69        | 53,44        | 421,9           |
| 3                    | 39,98        | 47,37        | 374,0           | 3                    | 42,90        | 50,51        | 398,7           | 3                    | 45,73        | 53,49        | 422,3           |
| 2                    | 40,03        | 47,42        | 374,4           | 2                    | 42,95        | 50,56        | 399,1           | 2                    | 45,78        | 53,54        | 422,7           |
| 1                    | 40,08        | 47,48        | 374,8           | 1                    | 43,00        | 50,61        | 399,5           | 1                    | 45,83        | 53,58        | 423,0           |
| 0                    | 40,13        | 47,53        | 375,2           | 0                    | 43,05        | 50,66        | 399,9           | 0                    | 45,87        | 53,63        | 423,4           |
| <b>0,9349</b>        | <b>40,18</b> | <b>47,58</b> | <b>375,6</b>    | <b>0,9289</b>        | <b>43,10</b> | <b>50,71</b> | <b>400,3</b>    | <b>0,9229</b>        | <b>45,92</b> | <b>53,68</b> | <b>423,8</b>    |
| 8                    | 40,23        | 47,63        | 376,0           | 8                    | 43,14        | 50,76        | 400,7           | 8                    | 45,97        | 53,73        | 424,2           |
| 7                    | 40,28        | 47,69        | 376,5           | 7                    | 43,19        | 50,82        | 401,1           | 7                    | 46,01        | 53,77        | 424,6           |
| 6                    | 40,33        | 47,74        | 376,9           | 6                    | 43,24        | 50,87        | 401,5           | 6                    | 46,06        | 53,83        | 424,9           |
| 5                    | 40,38        | 47,79        | 377,3           | 5                    | 43,29        | 50,92        | 401,9           | 5                    | 46,10        | 53,87        | 425,3           |
| 4                    | 40,43        | 47,84        | 377,7           | 4                    | 43,33        | 50,97        | 402,3           | 4                    | 46,15        | 53,92        | 425,7           |
| 3                    | 40,48        | 47,90        | 378,1           | 3                    | 43,38        | 51,02        | 402,7           | 3                    | 46,20        | 53,97        | 426,1           |
| 2                    | 40,43        | 47,95        | 378,5           | 2                    | 43,43        | 51,07        | 403,1           | 2                    | 46,24        | 54,02        | 426,5           |
| 1                    | 40,57        | 48,00        | 379,0           | 1                    | 43,48        | 51,12        | 403,5           | 1                    | 46,29        | 54,07        | 426,8           |
| 0                    | 40,62        | 48,05        | 379,4           | 0                    | 43,52        | 51,17        | 403,9           | 0                    | 46,34        | 54,12        | 427,2           |
| <b>0,9339</b>        | <b>40,67</b> | <b>48,11</b> | <b>379,8</b>    | <b>0,9279</b>        | <b>43,57</b> | <b>51,22</b> | <b>404,3</b>    | <b>0,9219</b>        | <b>46,38</b> | <b>54,16</b> | <b>427,6</b>    |
| 8                    | 40,72        | 48,16        | 380,2           | 8                    | 43,62        | 51,27        | 404,7           | 8                    | 46,43        | 54,21        | 428,0           |
| 7                    | 40,77        | 48,21        | 380,6           | 7                    | 43,67        | 51,32        | 405,1           | 7                    | 46,47        | 54,26        | 428,4           |
| 6                    | 40,82        | 48,26        | 381,0           | 6                    | 43,71        | 51,37        | 405,5           | 6                    | 46,52        | 54,31        | 428,7           |
| 5                    | 40,87        | 48,32        | 381,4           | 5                    | 43,76        | 51,42        | 405,9           | 5                    | 46,57        | 54,36        | 429,1           |
| 4                    | 40,92        | 48,37        | 381,9           | 4                    | 43,81        | 51,47        | 406,3           | 4                    | 46,61        | 54,40        | 429,5           |
| 3                    | 40,97        | 48,42        | 382,3           | 3                    | 43,86        | 51,52        | 406,7           | 3                    | 46,66        | 54,45        | 429,9           |
| 2                    | 41,02        | 48,47        | 382,7           | 2                    | 43,90        | 51,58        | 407,1           | 2                    | 46,70        | 54,50        | 430,3           |
| 1                    | 41,07        | 48,52        | 383,1           | 1                    | 43,95        | 51,62        | 407,5           | 1                    | 46,75        | 54,55        | 430,6           |
| 0                    | 41,12        | 48,58        | 383,5           | 0                    | 44,00        | 51,67        | 407,9           | 0                    | 46,80        | 54,60        | 431,0           |
| <b>0,9329</b>        | <b>41,16</b> | <b>48,63</b> | <b>383,9</b>    | <b>0,9269</b>        | <b>44,05</b> | <b>51,72</b> | <b>408,3</b>    | <b>0,9209</b>        | <b>46,84</b> | <b>54,64</b> | <b>431,4</b>    |
| 8                    | 41,21        | 48,68        | 384,3           | 8                    | 44,09        | 51,77        | 408,6           | 8                    | 46,89        | 54,69        | 431,8           |
| 7                    | 41,26        | 48,73        | 384,8           | 7                    | 44,14        | 51,82        | 409,0           | 7                    | 46,94        | 54,74        | 432,1           |
| 6                    | 41,31        | 48,79        | 385,2           | 6                    | 44,19        | 51,87        | 409,4           | 6                    | 46,98        | 54,79        | 432,5           |
| 5                    | 41,36        | 48,84        | 385,6           | 5                    | 44,24        | 51,92        | 409,8           | 5                    | 47,03        | 54,83        | 432,9           |
| 4                    | 41,41        | 48,89        | 386,0           | 4                    | 44,28        | 51,97        | 410,3           | 4                    | 47,07        | 54,88        | 433,3           |
| 3                    | 41,46        | 48,94        | 386,4           | 3                    | 44,33        | 52,02        | 410,6           | 3                    | 47,12        | 54,93        | 433,6           |
| 2                    | 41,50        | 49,00        | 386,8           | 2                    | 44,38        | 52,07        | 411,0           | 2                    | 47,17        | 54,98        | 434,0           |
| 1                    | 41,55        | 49,05        | 387,2           | 1                    | 44,42        | 52,12        | 411,4           | 1                    | 47,21        | 55,03        | 434,4           |
| 0                    | 41,60        | 49,10        | 387,7           | 0                    | 44,47        | 52,17        | 411,8           | 0                    | 47,26        | 55,07        | 434,8           |
| <b>0,9319</b>        | <b>41,65</b> | <b>49,15</b> | <b>388,1</b>    | <b>0,9259</b>        | <b>44,52</b> | <b>52,22</b> | <b>412,2</b>    | <b>0,9199</b>        | <b>47,30</b> | <b>55,12</b> | <b>435,1</b>    |
| 8                    | 41,70        | 49,20        | 388,5           | 8                    | 44,56        | 52,27        | 412,6           | 8                    | 47,35        | 55,17        | 435,5           |
| 7                    | 41,75        | 49,26        | 388,9           | 7                    | 44,61        | 52,32        | 413,0           | 7                    | 47,39        | 55,22        | 435,9           |
| 6                    | 41,80        | 49,31        | 389,3           | 6                    | 44,66        | 52,36        | 413,4           | 6                    | 47,44        | 55,26        | 436,3           |
| 5                    | 41,84        | 49,36        | 389,7           | 5                    | 44,71        | 52,41        | 413,7           | 5                    | 47,49        | 55,31        | 436,6           |
| 4                    | 41,89        | 49,41        | 390,1           | 4                    | 44,75        | 52,46        | 414,1           | 4                    | 47,53        | 55,36        | 437,0           |
| 3                    | 41,94        | 49,47        | 390,5           | 3                    | 44,80        | 52,51        | 414,5           | 3                    | 47,58        | 55,40        | 437,4           |
| 2                    | 41,99        | 49,52        | 391,0           | 2                    | 44,85        | 52,56        | 414,9           | 2                    | 47,62        | 55,45        | 437,7           |
| 1                    | 42,04        | 49,57        | 391,4           | 1                    | 44,89        | 52,61        | 415,3           | 1                    | 47,67        | 55,50        | 438,1           |
| 0                    | 42,09        | 49,62        | 391,8           | 0                    | 44,94        | 52,66        | 415,7           | 0                    | 47,72        | 55,55        | 438,5           |
| <b>0,9309</b>        | <b>42,14</b> | <b>49,58</b> | <b>392,2</b>    | <b>0,9249</b>        | <b>44,99</b> | <b>52,71</b> | <b>416,1</b>    | <b>0,9189</b>        | <b>47,76</b> | <b>55,59</b> | <b>438,9</b>    |
| 8                    | 42,18        | 49,72        | 392,6           | 8                    | 45,03        | 52,76        | 416,5           | 8                    | 47,81        | 55,64        | 439,2           |
| 7                    | 42,23        | 49,78        | 393,0           | 7                    | 45,08        | 52,80        | 416,9           | 7                    | 47,85        | 55,69        | 439,6           |
| 6                    | 42,28        | 49,83        | 393,4           | 6                    | 45,13        | 52,85        | 417,2           | 6                    | 47,90        | 55,74        | 440,0           |
| 5                    | 42,33        | 49,89        | 393,8           | 5                    | 45,17        | 52,90        | 417,6           | 5                    | 47,94        | 55,78        | 440,3           |
| 4                    | 42,38        | 49,94        | 394,2           | 4                    | 45,22        | 52,95        | 418,0           | 4                    | 47,99        | 55,83        | 440,7           |
| 3                    | 42,42        | 49,99        | 394,6           | 3                    | 45,27        | 53,00        | 418,4           | 3                    | 48,04        | 55,88        | 441,1           |
| 2                    | 42,47        | 50,04        | 395,0           | 2                    | 45,31        | 53,05        | 418,8           | 2                    | 48,08        | 55,92        | 441,5           |
| 1                    | 42,52        | 50,09        | 395,5           | 1                    | 45,36        | 53,10        | 419,2           | 1                    | 48,13        | 55,97        | 441,8           |
| 0                    | 42,57        | 50,15        | 395,9           | 0                    | 45,41        | 53,15        | 419,6           | 0                    | 48,17        | 56,02        | 442,2           |

| Dichte<br>$d^{20}_4$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20}_4$ | Alkohol      |              |                 |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |
| <b>0,9179</b>        | <b>48,22</b> | <b>56,06</b> | <b>442,6</b>    | <b>0,9119</b>        | <b>50,93</b> | <b>58,83</b> | <b>464,5</b>    | <b>0,9059</b>        | <b>53,59</b> | <b>61,50</b> | <b>485,5</b>    |
| 8                    | 48,26        | 56,11        | 442,9           | 8                    | 50,98        | 58,88        | 464,8           | 8                    | 53,63        | 61,54        | 485,8           |
| 7                    | 48,31        | 56,16        | 443,3           | 7                    | 51,02        | 58,92        | 465,2           | 7                    | 53,68        | 61,58        | 486,1           |
| 6                    | 48,36        | 56,21        | 443,7           | 6                    | 51,07        | 58,97        | 465,5           | 6                    | 53,72        | 61,63        | 486,5           |
| 5                    | 48,40        | 56,25        | 444,0           | 5                    | 51,11        | 59,01        | 465,9           | 5                    | 53,76        | 61,67        | 486,8           |
| 4                    | 48,45        | 56,30        | 444,4           | 4                    | 51,15        | 59,06        | 466,2           | 4                    | 53,81        | 61,71        | 487,2           |
| 3                    | 48,49        | 56,35        | 444,8           | 3                    | 51,20        | 59,10        | 466,6           | 3                    | 53,85        | 61,76        | 487,5           |
| 2                    | 48,54        | 56,39        | 445,2           | 2                    | 51,24        | 59,15        | 466,9           | 2                    | 53,89        | 61,80        | 487,9           |
| 1                    | 48,59        | 56,44        | 445,5           | 1                    | 51,29        | 59,19        | 467,3           | 1                    | 53,94        | 61,84        | 488,2           |
| 0                    | 48,63        | 56,49        | 445,9           | 0                    | 51,33        | 59,24        | 467,7           | 0                    | 53,98        | 61,89        | 488,5           |
| <b>0,9169</b>        | <b>48,68</b> | <b>56,53</b> | <b>446,3</b>    | <b>0,9109</b>        | <b>51,38</b> | <b>59,28</b> | <b>468,0</b>    | <b>0,9049</b>        | <b>54,03</b> | <b>61,93</b> | <b>488,9</b>    |
| 8                    | 48,72        | 56,58        | 446,6           | 8                    | 51,42        | 59,33        | 468,4           | 8                    | 54,07        | 61,97        | 489,2           |
| 7                    | 48,77        | 56,63        | 447,0           | 7                    | 51,47        | 59,37        | 468,7           | 7                    | 54,11        | 62,02        | 489,6           |
| 6                    | 48,81        | 56,67        | 447,4           | 6                    | 51,51        | 59,42        | 469,1           | 6                    | 54,16        | 62,06        | 489,9           |
| 5                    | 48,86        | 56,72        | 447,7           | 5                    | 51,56        | 59,46        | 469,4           | 5                    | 54,20        | 62,10        | 490,3           |
| 4                    | 48,90        | 56,77        | 448,1           | 4                    | 51,60        | 59,51        | 469,8           | 4                    | 54,25        | 62,15        | 490,6           |
| 3                    | 48,95        | 56,82        | 448,5           | 3                    | 51,64        | 59,55        | 470,1           | 3                    | 54,29        | 62,19        | 490,9           |
| 2                    | 48,99        | 56,86        | 448,8           | 2                    | 51,69        | 59,60        | 470,5           | 2                    | 54,33        | 62,23        | 491,3           |
| 1                    | 49,04        | 56,90        | 449,2           | 1                    | 51,73        | 59,64        | 470,8           | 1                    | 54,38        | 62,28        | 491,6           |
| 0                    | 49,08        | 56,95        | 449,6           | 0                    | 51,78        | 59,69        | 471,2           | 0                    | 54,42        | 62,32        | 492,0           |
| <b>0,9159</b>        | <b>49,13</b> | <b>57,00</b> | <b>449,9</b>    | <b>0,9099</b>        | <b>51,82</b> | <b>59,73</b> | <b>471,5</b>    | <b>0,9039</b>        | <b>54,46</b> | <b>62,36</b> | <b>492,3</b>    |
| 8                    | 49,17        | 57,04        | 450,3           | 8                    | 51,87        | 59,78        | 471,9           | 8                    | 54,51        | 62,40        | 492,6           |
| 7                    | 49,22        | 57,09        | 450,7           | 7                    | 51,91        | 59,82        | 472,2           | 7                    | 54,55        | 62,45        | 493,0           |
| 6                    | 49,26        | 57,14        | 451,0           | 6                    | 51,96        | 59,86        | 472,6           | 6                    | 54,60        | 62,49        | 493,3           |
| 5                    | 49,31        | 57,18        | 451,4           | 5                    | 52,00        | 59,91        | 472,9           | 5                    | 54,64        | 62,54        | 493,7           |
| 4                    | 49,35        | 57,23        | 451,8           | 4                    | 52,04        | 59,95        | 473,3           | 4                    | 54,68        | 62,58        | 494,0           |
| 3                    | 49,40        | 57,28        | 452,1           | 3                    | 52,09        | 60,00        | 473,6           | 3                    | 54,73        | 62,62        | 494,3           |
| 2                    | 49,44        | 57,32        | 452,5           | 2                    | 52,13        | 60,04        | 474,0           | 2                    | 54,77        | 62,66        | 494,7           |
| 1                    | 49,49        | 57,37        | 452,9           | 1                    | 52,18        | 60,09        | 474,3           | 1                    | 54,82        | 62,71        | 495,0           |
| 0                    | 49,53        | 57,41        | 453,2           | 0                    | 52,22        | 60,13        | 474,7           | 0                    | 54,86        | 62,75        | 495,3           |
| <b>0,9149</b>        | <b>49,58</b> | <b>57,46</b> | <b>453,6</b>    | <b>0,9089</b>        | <b>52,27</b> | <b>60,18</b> | <b>475,0</b>    | <b>0,9029</b>        | <b>54,90</b> | <b>62,79</b> | <b>495,7</b>    |
| 8                    | 49,62        | 57,51        | 454,0           | 8                    | 52,31        | 60,22        | 475,4           | 8                    | 54,95        | 62,84        | 496,1           |
| 7                    | 49,67        | 57,55        | 454,3           | 7                    | 52,35        | 60,26        | 475,7           | 7                    | 54,99        | 62,88        | 496,4           |
| 6                    | 49,71        | 57,60        | 454,7           | 6                    | 52,40        | 60,31        | 476,1           | 6                    | 55,04        | 62,92        | 496,7           |
| 5                    | 49,76        | 57,64        | 455,1           | 5                    | 52,44        | 60,35        | 476,4           | 5                    | 55,08        | 62,97        | 497,1           |
| 4                    | 49,81        | 57,69        | 455,4           | 4                    | 52,49        | 60,40        | 476,8           | 4                    | 55,12        | 63,01        | 497,4           |
| 3                    | 49,85        | 57,74        | 455,8           | 3                    | 52,53        | 60,44        | 477,1           | 3                    | 55,17        | 63,05        | 497,8           |
| 2                    | 49,90        | 57,78        | 456,2           | 2                    | 52,58        | 60,49        | 477,5           | 2                    | 55,21        | 63,09        | 498,1           |
| 1                    | 49,94        | 57,83        | 456,5           | 1                    | 52,62        | 60,53        | 477,8           | 1                    | 55,25        | 63,14        | 498,4           |
| 0                    | 49,99        | 57,87        | 456,9           | 0                    | 52,66        | 60,58        | 478,2           | 0                    | 55,30        | 63,18        | 498,8           |
| <b>0,9139</b>        | <b>50,03</b> | <b>57,92</b> | <b>457,3</b>    | <b>0,9079</b>        | <b>52,71</b> | <b>60,62</b> | <b>478,5</b>    | <b>0,9019</b>        | <b>55,34</b> | <b>63,23</b> | <b>499,1</b>    |
| 8                    | 50,08        | 57,97        | 457,6           | 8                    | 52,75        | 60,66        | 478,9           | 8                    | 55,39        | 63,27        | 499,5           |
| 7                    | 50,12        | 58,01        | 458,0           | 7                    | 52,80        | 60,71        | 479,2           | 7                    | 55,43        | 63,31        | 499,8           |
| 6                    | 50,17        | 58,06        | 458,3           | 6                    | 52,84        | 60,75        | 479,6           | 6                    | 55,47        | 63,35        | 500,1           |
| 5                    | 50,21        | 58,10        | 458,7           | 5                    | 52,88        | 60,80        | 479,9           | 5                    | 55,52        | 63,40        | 500,5           |
| 4                    | 50,26        | 58,15        | 459,1           | 4                    | 52,93        | 60,84        | 480,2           | 4                    | 55,56        | 63,44        | 500,8           |
| 3                    | 50,30        | 58,19        | 459,4           | 3                    | 52,97        | 60,88        | 480,6           | 3                    | 55,61        | 63,48        | 501,2           |
| 2                    | 50,35        | 58,24        | 459,8           | 2                    | 53,02        | 60,93        | 480,9           | 2                    | 55,65        | 63,53        | 501,5           |
| 1                    | 50,39        | 58,29        | 460,1           | 1                    | 53,06        | 60,97        | 481,3           | 1                    | 55,69        | 63,57        | 501,8           |
| 0                    | 50,44        | 58,33        | 460,5           | 0                    | 53,11        | 61,02        | 481,6           | 0                    | 55,74        | 63,61        | 502,2           |
| <b>0,9129</b>        | <b>50,48</b> | <b>58,38</b> | <b>460,9</b>    | <b>0,9069</b>        | <b>53,15</b> | <b>61,06</b> | <b>482,0</b>    | <b>0,9009</b>        | <b>55,78</b> | <b>63,66</b> | <b>502,6</b>    |
| 8                    | 50,53        | 58,42        | 461,2           | 8                    | 53,19        | 61,10        | 482,3           | 8                    | 55,82        | 63,70        | 502,9           |
| 7                    | 50,57        | 58,47        | 461,6           | 7                    | 53,24        | 61,15        | 482,7           | 7                    | 55,87        | 63,74        | 503,2           |
| 6                    | 50,62        | 58,51        | 461,9           | 6                    | 53,28        | 61,19        | 483,0           | 6                    | 55,91        | 63,79        | 503,5           |
| 5                    | 50,66        | 58,56        | 462,3           | 5                    | 53,32        | 61,23        | 483,4           | 5                    | 55,96        | 63,83        | 503,9           |
| 4                    | 50,71        | 58,60        | 462,7           | 4                    | 53,37        | 61,28        | 483,7           | 4                    | 56,00        | 63,87        | 504,2           |
| 3                    | 50,75        | 58,65        | 463,0           | 3                    | 53,41        | 61,32        | 484,1           | 3                    | 56,04        | 63,91        | 504,6           |
| 2                    | 50,80        | 58,69        | 463,4           | 2                    | 53,46        | 61,36        | 484,4           | 2                    | 56,09        | 63,96        | 504,9           |
| 1                    | 50,84        | 58,74        | 463,7           | 1                    | 53,50        | 61,41        | 484,8           | 1                    | 56,13        | 64,00        | 505,2           |
| 0                    | 50,89        | 58,79        | 464,1           | 0                    | 53,54        | 61,45        | 485,1           | 0                    | 56,18        | 64,04        | 505,6           |

| Dichte<br>$d^{20}/_4$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20}/_4$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20}/_4$ | Alkohol      |              |                 |
|-----------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|--------------|-----------------|
|                       | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                       | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                       | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |
| <b>0,8995</b>         | <b>56,39</b> | <b>64,26</b> | <b>507,3</b>    | <b>0,8695</b>         | <b>69,22</b> | <b>76,24</b> | <b>601,9</b>    | <b>0,8395</b>         | <b>81,59</b> | <b>86,76</b> | <b>684,9</b>    |
| 90                    | 56,61        | 64,47        | 508,9           | 90                    | 69,43        | 76,43        | 603,4           | 90                    | 81,79        | 86,92        | 686,2           |
| 85                    | 56,83        | 64,68        | 510,6           | 85                    | 69,64        | 76,62        | 604,8           | 85                    | 81,99        | 87,09        | 687,5           |
| 80                    | 57,05        | 64,89        | 512,3           | 80                    | 69,85        | 76,80        | 606,3           | 80                    | 82,19        | 87,25        | 688,8           |
| 75                    | 57,26        | 65,11        | 513,9           | 75                    | 70,06        | 76,99        | 607,8           | 75                    | 82,39        | 87,41        | 690,0           |
| 70                    | 57,48        | 65,32        | 515,6           | 70                    | 70,27        | 77,18        | 609,2           | 70                    | 82,59        | 87,57        | 691,3           |
| 65                    | 57,70        | 65,52        | 517,2           | 65                    | 70,48        | 77,36        | 610,7           | 65                    | 82,79        | 87,73        | 692,6           |
| 60                    | 57,91        | 65,73        | 518,9           | 60                    | 70,69        | 77,55        | 612,2           | 60                    | 82,99        | 87,89        | 693,8           |
| 55                    | 58,13        | 65,94        | 520,5           | 55                    | 70,90        | 77,73        | 613,6           | 55                    | 83,19        | 88,05        | 695,1           |
| 50                    | 58,34        | 66,15        | 522,2           | 50                    | 71,11        | 77,92        | 615,1           | 50                    | 83,39        | 88,21        | 696,3           |
| 45                    | 58,56        | 66,35        | 523,8           | 45                    | 71,32        | 78,10        | 616,5           | 45                    | 83,59        | 88,36        | 697,6           |
| 40                    | 58,78        | 66,56        | 525,5           | 40                    | 71,52        | 78,28        | 618,0           | 40                    | 83,79        | 88,52        | 698,8           |
| 35                    | 58,99        | 66,77        | 527,1           | 35                    | 71,73        | 78,47        | 619,4           | 35                    | 83,99        | 88,68        | 700,0           |
| 30                    | 59,21        | 66,97        | 528,7           | 30                    | 71,94        | 78,65        | 620,9           | 30                    | 84,19        | 88,83        | 701,3           |
| 25                    | 59,42        | 67,18        | 530,4           | 25                    | 72,15        | 78,83        | 622,3           | 25                    | 84,39        | 88,99        | 702,5           |
| 20                    | 59,64        | 67,39        | 532,0           | 20                    | 72,36        | 79,02        | 623,8           | 20                    | 84,59        | 89,15        | 703,7           |
| 15                    | 59,86        | 67,59        | 533,6           | 15                    | 72,57        | 79,20        | 625,2           | 15                    | 84,78        | 89,30        | 704,9           |
| 10                    | 60,07        | 67,80        | 535,2           | 10                    | 72,78        | 79,38        | 626,6           | 10                    | 84,98        | 89,45        | 706,2           |
| 05                    | 60,29        | 68,00        | 536,9           | 05                    | 72,99        | 79,56        | 628,1           | 05                    | 85,18        | 89,61        | 707,4           |
| 00                    | 60,50        | 68,21        | 538,5           | 00                    | 73,20        | 79,74        | 629,5           | 00                    | 85,37        | 89,76        | 708,6           |
| <b>0,8895</b>         | <b>60,72</b> | <b>68,42</b> | <b>540,1</b>    | <b>0,8595</b>         | <b>73,40</b> | <b>79,92</b> | <b>630,9</b>    | <b>0,8295</b>         | <b>85,57</b> | <b>89,91</b> | <b>709,8</b>    |
| 90                    | 60,93        | 68,62        | 541,7           | 90                    | 73,61        | 80,10        | 632,3           | 90                    | 85,76        | 90,06        | 711,0           |
| 85                    | 61,15        | 68,82        | 543,3           | 85                    | 73,82        | 80,28        | 633,0           | 85                    | 85,96        | 90,21        | 712,2           |
| 80                    | 61,36        | 69,03        | 544,9           | 80                    | 74,03        | 80,46        | 635,1           | 80                    | 86,15        | 90,36        | 713,3           |
| 75                    | 61,58        | 69,23        | 546,5           | 75                    | 74,24        | 80,64        | 636,6           | 75                    | 86,34        | 90,51        | 714,5           |
| 70                    | 61,79        | 69,43        | 548,1           | 70                    | 74,44        | 80,81        | 638,0           | 70                    | 86,54        | 90,66        | 715,7           |
| 65                    | 62,01        | 69,63        | 549,7           | 65                    | 74,65        | 80,99        | 639,4           | 65                    | 86,73        | 90,81        | 716,8           |
| 60                    | 62,22        | 69,83        | 551,3           | 60                    | 74,86        | 81,17        | 640,8           | 60                    | 86,92        | 90,95        | 718,0           |
| 55                    | 62,44        | 70,03        | 552,9           | 55                    | 75,06        | 81,35        | 642,2           | 55                    | 87,12        | 91,10        | 719,2           |
| 50                    | 62,65        | 70,24        | 554,5           | 50                    | 75,27        | 81,52        | 643,6           | 50                    | 87,31        | 91,24        | 720,3           |
| 45                    | 62,86        | 70,44        | 556,0           | 45                    | 75,48        | 81,70        | 645,0           | 45                    | 87,51        | 91,39        | 721,5           |
| 40                    | 63,08        | 70,63        | 557,6           | 40                    | 75,68        | 81,87        | 646,3           | 40                    | 87,70        | 91,53        | 722,6           |
| 35                    | 63,29        | 70,83        | 559,2           | 35                    | 75,89        | 82,05        | 647,7           | 35                    | 87,89        | 91,68        | 723,8           |
| 30                    | 63,50        | 71,03        | 560,8           | 30                    | 76,09        | 82,22        | 649,1           | 30                    | 88,08        | 91,82        | 724,9           |
| 25                    | 63,72        | 71,23        | 562,3           | 25                    | 76,30        | 82,40        | 650,5           | 25                    | 88,27        | 91,97        | 726,1           |
| 20                    | 63,93        | 71,43        | 563,9           | 20                    | 76,50        | 82,57        | 651,8           | 20                    | 88,47        | 92,11        | 727,2           |
| 15                    | 64,14        | 71,63        | 565,5           | 15                    | 76,71        | 82,74        | 653,2           | 15                    | 88,66        | 92,26        | 728,3           |
| 10                    | 64,36        | 71,83        | 567,0           | 10                    | 76,91        | 82,91        | 654,5           | 10                    | 88,85        | 92,40        | 729,5           |
| 05                    | 64,57        | 72,02        | 568,6           | 05                    | 77,12        | 83,08        | 655,9           | 05                    | 89,05        | 92,55        | 730,6           |
| 0                     | 64,78        | 72,22        | 570,1           | 00                    | 77,32        | 83,26        | 657,2           | 00                    | 89,24        | 92,69        | 731,8           |
| <b>0,8795</b>         | <b>65,00</b> | <b>72,41</b> | <b>571,6</b>    | <b>0,8495</b>         | <b>77,53</b> | <b>83,43</b> | <b>658,6</b>    | <b>0,8195</b>         | <b>89,43</b> | <b>92,84</b> | <b>732,9</b>    |
| 90                    | 65,21        | 72,61        | 573,2           | 90                    | 77,73        | 83,60        | 659,9           | 90                    | 89,62        | 92,98        | 734,0           |
| 85                    | 65,42        | 72,80        | 574,7           | 85                    | 77,94        | 83,77        | 661,3           | 85                    | 89,81        | 93,12        | 735,1           |
| 80                    | 65,63        | 73,00        | 576,2           | 80                    | 78,14        | 83,94        | 662,6           | 80                    | 90,00        | 93,26        | 736,2           |
| 75                    | 65,85        | 73,19        | 577,8           | 75                    | 78,34        | 84,11        | 664,0           | 75                    | 90,19        | 93,40        | 737,3           |
| 70                    | 66,06        | 73,39        | 579,3           | 70                    | 78,55        | 84,27        | 665,3           | 70                    | 90,38        | 93,54        | 738,4           |
| 65                    | 66,27        | 73,58        | 580,8           | 65                    | 78,75        | 84,44        | 666,6           | 65                    | 90,57        | 93,68        | 739,5           |
| 60                    | 66,48        | 73,78        | 582,4           | 60                    | 78,95        | 84,61        | 667,9           | 60                    | 90,76        | 93,81        | 740,5           |
| 55                    | 66,69        | 73,97        | 583,9           | 55                    | 79,16        | 84,78        | 669,3           | 55                    | 90,94        | 93,95        | 741,6           |
| 50                    | 66,91        | 74,16        | 585,4           | 50                    | 79,36        | 84,95        | 670,6           | 50                    | 91,13        | 94,08        | 742,7           |
| 45                    | 67,12        | 74,35        | 587,0           | 45                    | 79,56        | 85,11        | 671,9           | 45                    | 91,31        | 94,21        | 743,7           |
| 40                    | 67,33        | 74,54        | 588,5           | 40                    | 79,76        | 85,28        | 673,2           | 40                    | 91,50        | 94,34        | 744,8           |
| 35                    | 67,54        | 74,73        | 590,0           | 35                    | 79,97        | 85,45        | 674,5           | 35                    | 91,68        | 94,47        | 745,8           |
| 30                    | 67,75        | 74,92        | 591,5           | 30                    | 80,17        | 85,61        | 675,8           | 30                    | 91,86        | 94,60        | 746,9           |
| 25                    | 67,96        | 75,11        | 593,0           | 25                    | 80,37        | 85,78        | 677,1           | 25                    | 92,05        | 94,73        | 747,9           |
| 20                    | 68,17        | 75,30        | 594,5           | 20                    | 80,58        | 85,94        | 678,4           | 20                    | 92,23        | 94,86        | 748,9           |
| 15                    | 68,38        | 75,49        | 596,0           | 15                    | 80,78        | 86,11        | 679,7           | 15                    | 92,41        | 94,99        | 749,9           |
| 10                    | 68,59        | 75,68        | 597,5           | 10                    | 80,98        | 86,27        | 681,0           | 10                    | 92,59        | 95,12        | 750,9           |
| 05                    | 68,80        | 75,87        | 599,0           | 05                    | 81,18        | 86,43        | 682,3           | 05                    | 92,77        | 95,25        | 751,9           |
| 00                    | 69,01        | 76,06        | 600,4           | 00                    | 81,38        | 86,60        | 683,6           | 00                    | 92,95        | 95,38        | 752,9           |

| Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol      |              |                 | Dichte<br>$d^{20/4}$ | Alkohol       |               |                 |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|---------------|---------------|-----------------|
|                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%   | Raum-<br>%   | g in<br>1 Liter |                      | Gew.-<br>%    | Raum-<br>%    | g in<br>1 Liter |
| <b>0,8095</b>        | <b>93,13</b> | <b>95,50</b> | <b>753,9</b>    | 20                   | 95,78        | 97,32        | 768,3           | 50                   | 98,17         | 98,87         | 780,5           |
| 90                   | 93,31        | 95,63        | 754,9           | 15                   | 95,96        | 97,43        | 769,2           | 45                   | 98,34         | 98,98         | 781,3           |
| 85                   | 93,49        | 95,75        | 755,9           | 10                   | 96,13        | 97,55        | 770,1           | 40                   | 98,51         | 99,08         | 782,2           |
| 80                   | 93,67        | 95,88        | 756,9           | 05                   | 96,30        | 97,66        | 770,9           | 35                   | 98,67         | 99,19         | 783,0           |
| 75                   | 93,85        | 96,00        | 757,9           | 00                   | 96,48        | 97,77        | 771,8           | 30                   | 98,84         | 99,29         | 783,8           |
| 70                   | 94,03        | 96,13        | 758,8           |                      |              |              |                 | 25                   | 99,00         | 99,39         | 784,6           |
| 65                   | 94,21        | 96,25        | 759,8           | <b>0,7995</b>        | <b>96,65</b> | <b>97,88</b> | <b>772,7</b>    | 20                   | 99,16         | 99,49         | 785,4           |
| 60                   | 94,38        | 96,37        | 760,8           | 90                   | 96,82        | 97,99        | 773,6           | 15                   | 99,53         | 99,59         | 786,2           |
| 55                   | 94,56        | 96,49        | 761,7           | 85                   | 96,99        | 98,10        | 774,4           | 10                   | 99,69         | 99,69         | 787,0           |
| 50                   | 94,74        | 96,61        | 762,7           | 80                   | 97,16        | 98,21        | 775,3           | 05                   | 99,65         | 99,79         | 787,7           |
| 45                   | 94,91        | 96,73        | 763,6           | 75                   | 97,33        | 98,32        | 776,2           | 00                   | 99,81         | 99,88         | 788,5           |
| 40                   | 95,09        | 96,85        | 764,6           | 70                   | 97,50        | 98,43        | 777,0           |                      |               |               |                 |
| 35                   | 95,26        | 96,97        | 765,5           | 65                   | 97,67        | 98,54        | 777,9           | <b>0,7895</b>        | <b>99,97</b>  | <b>99,98</b>  | <b>789,3</b>    |
| 30                   | 95,44        | 97,09        | 766,4           | 60                   | 97,84        | 98,65        | 778,8           |                      |               |               |                 |
| 25                   | 95,61        | 97,21        | 767,3           | 55                   | 98,01        | 98,76        | 779,6           | <b>0,78942</b>       | <b>100,00</b> | <b>100,00</b> | <b>789,4</b>    |

Tabelle IX. Refraktion von Äthylalkohol-Wasser-Mischungen.  
Skalenteile des Eintauchrefraktometers von ZEISS bei 17,5° (vgl. S. 1011).

| Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <b>15,0</b>      | <b>0,00</b>       | 5                | 21                | <b>22,0</b>      | <b>4,32</b>       | 5                | 30                | <b>29,0</b>      | <b>8,18</b>       | 5                | 10,03             |
| 1                | 06                | 6                | 27                | 1                | 38                | 6                | 35                | 1                | 23                | 6                | 08                |
| 2                | 13                | 7                | 33                | 2                | 44                | 7                | 41                | 2                | 29                | 7                | 14                |
| 3                | 19                | 8                | 40                | 3                | 49                | 8                | 46                | 3                | 34                | 8                | 19                |
| 4                | 25                | 9                | 46                | 4                | 55                | 9                | 52                | 4                | 39                | 9                | 24                |
| 5                | 32                |                  |                   | 5                | 61                |                  |                   | 5                | 45                |                  |                   |
| 6                | 38                | <b>19,0</b>      | <b>2,52</b>       | 6                | 67                | <b>26,0</b>      | <b>6,57</b>       | 6                | 50                | <b>33,0</b>      | <b>10,29</b>      |
| 7                | 45                | 1                | 58                | 7                | 72                | 1                | 62                | 7                | 55                | 1                | 35                |
| 8                | 51                | 2                | 64                | 8                | 78                | 2                | 68                | 8                | 61                | 2                | 40                |
| 9                | 57                | 3                | 70                | 9                | 84                | 3                | 73                | 9                | 66                | 3                | 45                |
|                  |                   | 4                | 77                |                  |                   | 4                | 79                |                  |                   | 4                | 50                |
| <b>16,0</b>      | <b>0,64</b>       | 5                | 83                | <b>23,0</b>      | <b>4,90</b>       | 5                | 84                | <b>30,0</b>      | <b>8,71</b>       | 5                | 56                |
| 1                | 70                | 6                | 89                | 1                | 95                | 6                | 89                | 1                | 76                | 6                | 61                |
| 2                | 77                | 7                | 95                | 2                | 5,01              | 7                | 95                | 2                | 82                | 7                | 66                |
| 3                | 83                | 8                | 3,01              | 3                | 07                | 8                | 7,00              | 3                | 87                | 8                | 71                |
| 4                | 89                | 9                | 07                | 4                | 12                | 9                | 06                | 4                | 92                | 9                | 76                |
| 5                | 96                |                  |                   | 5                | 18                |                  |                   | 5                | 98                |                  |                   |
| 6                | 1,02              | <b>20,0</b>      | <b>3,13</b>       | 6                | 24                | <b>27,0</b>      | <b>7,11</b>       | 6                | 9,03              | <b>34,0</b>      | <b>10,82</b>      |
| 7                | 08                | 1                | 19                | 7                | 29                | 1                | 16                | 7                | 08                | 1                | 87                |
| 8                | 15                | 2                | 25                | 8                | 35                | 2                | 22                | 8                | 14                | 2                | 92                |
| 9                | 21                | 3                | 31                | 9                | 41                | 3                | 27                | 9                | 19                | 3                | 97                |
|                  |                   | 4                | 37                |                  |                   | 4                | 33                |                  |                   | 4                | 11,03             |
| <b>17,0</b>      | <b>1,27</b>       | 5                | 43                | <b>24,0</b>      | <b>5,46</b>       | 5                | 38                | <b>31,0</b>      | <b>9,24</b>       | 5                | 08                |
| 1                | 34                | 6                | 49                | 1                | 52                | 6                | 43                | 1                | 29                | 6                | 13                |
| 2                | 40                | 7                | 55                | 2                | 58                | 7                | 49                | 2                | 35                | 7                | 18                |
| 3                | 46                | 8                | 61                | 3                | 63                | 8                | 54                | 3                | 40                | 8                | 23                |
| 4                | 53                | 9                | 67                | 4                | 69                | 9                | 60                | 4                | 45                | 9                | 29                |
| 5                | 59                |                  |                   | 5                | 74                |                  |                   | 5                | 51                |                  |                   |
| 6                | 65                | <b>21,0</b>      | <b>3,73</b>       | 6                | 80                | <b>28,0</b>      | <b>7,65</b>       | 6                | 56                | <b>35,0</b>      | <b>11,34</b>      |
| 7                | 71                | 1                | 79                | 7                | 86                | 1                | 70                | 7                | 61                | 1                | 39                |
| 8                | 78                | 2                | 85                | 8                | 91                | 2                | 76                | 8                | 66                | 2                | 44                |
| 9                | 84                | 3                | 91                | 9                | 97                | 3                | 81                | 9                | 72                | 3                | 49                |
|                  |                   | 4                | 97                |                  |                   | 4                | 86                |                  |                   | 4                | 55                |
| <b>18,0</b>      | <b>1,90</b>       | 5                | 4,03              | <b>25,0</b>      | <b>6,02</b>       | 5                | 92                | <b>32,0</b>      | <b>9,77</b>       | 5                | 60                |
| 1                | 96                | 6                | 09                | 1                | 08                | 6                | 97                | 1                | 82                | 6                | 65                |
| 2                | 2,02              | 7                | 15                | 2                | 13                | 7                | 8,02              | 2                | 87                | 7                | 70                |
| 3                | 08                | 8                | 20                | 3                | 19                | 8                | 08                | 3                | 93                | 8                | 75                |
| 4                | 15                | 9                | 26                | 4                | 24                | 9                | 13                | 4                | 98                | 9                | 81                |



| Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <b>36,0</b>      | <b>11,86</b>      | <b>42,0</b>      | <b>14,88</b>      | <b>48,0</b>      | <b>17,86</b>      | <b>54,0</b>      | <b>20,95</b>      | <b>60,0</b>      | <b>24,07</b>      | <b>66,0</b>      | <b>27,41</b>      |
| 1                | 91                | 1                | 93                | 1                | 91                | 1                | 21,00             | 1                | 12                | 1                | 47                |
| 2                | 96                | 2                | 98                | 2                | 96                | 2                | 05                | 2                | 18                | 2                | 53                |
| 3                | 12,01             | 3                | 15,03             | 3                | 18,01             | 3                | 10                | 3                | 23                | 3                | 59                |
| 4                | 06                | 4                | 08                | 4                | 06                | 4                | 15                | 4                | 28                | 4                | 65                |
| 5                | 11                | 5                | 13                | 5                | 12                | 5                | 20                | 5                | 34                | 5                | 71                |
| 6                | 16                | 6                | 18                | 6                | 17                | 6                | 26                | 6                | 39                | 6                | 77                |
| 7                | 22                | 7                | 23                | 7                | 22                | 7                | 31                | 7                | 44                | 7                | 83                |
| 8                | 27                | 8                | 28                | 8                | 27                | 8                | 36                | 8                | 50                | 8                | 89                |
| 9                | 32                | 9                | 33                | 9                | 32                | 9                | 41                | 9                | 55                | 9                | 95                |
| <b>37,0</b>      | <b>12,37</b>      | <b>43,0</b>      | <b>15,38</b>      | <b>49,0</b>      | <b>18,37</b>      | <b>55,0</b>      | <b>21,46</b>      | <b>61,0</b>      | <b>24,60</b>      | <b>67,0</b>      | <b>28,01</b>      |
| 1                | 42                | 1                | 43                | 1                | 42                | 1                | 52                | 1                | 66                | 1                | 07                |
| 2                | 47                | 2                | 47                | 2                | 47                | 2                | 57                | 2                | 71                | 2                | 13                |
| 3                | 52                | 3                | 52                | 3                | 52                | 3                | 62                | 3                | 77                | 3                | 19                |
| 4                | 58                | 4                | 57                | 4                | 57                | 4                | 67                | 4                | 82                | 4                | 25                |
| 5                | 63                | 5                | 62                | 5                | 63                | 5                | 72                | 5                | 88                | 5                | 30                |
| 6                | 68                | 6                | 67                | 6                | 68                | 6                | 78                | 6                | 93                | 6                | 37                |
| 7                | 73                | 7                | 72                | 7                | 73                | 7                | 83                | 7                | 99                | 7                | 43                |
| 8                | 78                | 8                | 77                | 8                | 78                | 8                | 88                | 8                | 25,04             | 8                | 49                |
| 9                | 83                | 9                | 82                | 9                | 83                | 9                | 93                | 9                | 10                | 9                | 55                |
| <b>38,0</b>      | <b>12,88</b>      | <b>44,0</b>      | <b>15,87</b>      | <b>50,0</b>      | <b>18,88</b>      | <b>56,0</b>      | <b>21,98</b>      | <b>62,0</b>      | <b>25,15</b>      | <b>68,0</b>      | <b>28,61</b>      |
| 1                | 94                | 1                | 92                | 1                | 93                | 1                | 22,04             | 1                | 20                | 1                | 68                |
| 2                | 99                | 2                | 96                | 2                | 98                | 2                | 09                | 2                | 26                | 2                | 74                |
| 3                | 13,04             | 3                | 16,01             | 3                | 19,04             | 3                | 14                | 3                | 31                | 3                | 80                |
| 4                | 09                | 4                | 06                | 4                | 09                | 4                | 19                | 4                | 37                | 4                | 86                |
| 5                | 14                | 5                | 11                | 5                | 14                | 5                | 24                | 5                | 42                | 5                | 92                |
| 6                | 19                | 6                | 16                | 6                | 19                | 6                | 29                | 6                | 47                | 6                | 99                |
| 7                | 24                | 7                | 21                | 7                | 24                | 7                | 34                | 7                | 52                | 7                | 29,05             |
| 8                | 29                | 8                | 26                | 8                | 29                | 8                | 39                | 8                | 58                | 8                | 11                |
| 9                | 34                | 9                | 31                | 9                | 34                | 9                | 44                | 9                | 63                | 9                | 17                |
| <b>39,0</b>      | <b>13,39</b>      | <b>45,0</b>      | <b>16,36</b>      | <b>51,0</b>      | <b>19,40</b>      | <b>57,0</b>      | <b>22,50</b>      | <b>63,0</b>      | <b>25,69</b>      | <b>69,0</b>      | <b>29,23</b>      |
| 1                | 44                | 1                | 41                | 1                | 45                | 1                | 55                | 1                | 75                | 1                | 29                |
| 2                | 49                | 2                | 46                | 2                | 50                | 2                | 60                | 2                | 80                | 2                | 35                |
| 3                | 55                | 3                | 51                | 3                | 55                | 3                | 65                | 3                | 86                | 3                | 41                |
| 4                | 59                | 4                | 56                | 4                | 60                | 4                | 71                | 4                | 92                | 4                | 48                |
| 5                | 64                | 5                | 61                | 5                | 65                | 5                | 76                | 5                | 97                | 5                | 54                |
| 6                | 69                | 6                | 66                | 6                | 71                | 6                | 81                | 6                | 26,03             | 6                | 60                |
| 7                | 74                | 7                | 71                | 7                | 76                | 7                | 86                | 7                | 09                | 7                | 67                |
| 8                | 79                | 8                | 76                | 8                | 81                | 8                | 92                | 8                | 14                | 8                | 73                |
| 9                | 84                | 9                | 81                | 9                | 86                | 9                | 97                | 9                | 20                | 9                | 79                |
| <b>40,0</b>      | <b>13,89</b>      | <b>46,0</b>      | <b>16,86</b>      | <b>52,0</b>      | <b>19,91</b>      | <b>58,0</b>      | <b>23,02</b>      | <b>64,0</b>      | <b>26,26</b>      | <b>70,0</b>      | <b>29,86</b>      |
| 1                | 94                | 1                | 91                | 1                | 96                | 1                | 08                | 1                | 31                | 1                | 92                |
| 2                | 99                | 2                | 96                | 2                | 20,02             | 2                | 13                | 2                | 37                | 2                | 98                |
| 3                | 14,04             | 3                | 17,01             | 3                | 07                | 3                | 18                | 3                | 43                | 3                | 30,05             |
| 4                | 09                | 4                | 06                | 4                | 12                | 4                | 23                | 4                | 49                | 4                | 11                |
| 5                | 14                | 5                | 11                | 5                | 17                | 5                | 29                | 5                | 54                | 5                | 18                |
| 6                | 19                | 6                | 16                | 6                | 22                | 6                | 34                | 6                | 59                | 6                | 24                |
| 7                | 24                | 7                | 21                | 7                | 27                | 7                | 39                | 7                | 65                | 7                | 31                |
| 8                | 29                | 8                | 26                | 8                | 33                | 8                | 45                | 8                | 71                | 8                | 37                |
| 9                | 34                | 9                | 31                | 9                | 38                | 9                | 50                | 9                | 77                | 9                | 44                |
| <b>41,0</b>      | <b>14,39</b>      | <b>47,0</b>      | <b>17,36</b>      | <b>53,0</b>      | <b>20,43</b>      | <b>59,0</b>      | <b>23,55</b>      | <b>65,0</b>      | <b>26,82</b>      | <b>71,0</b>      | <b>30,50</b>      |
| 1                | 44                | 1                | 41                | 1                | 48                | 1                | 60                | 1                | 88                | 1                | 57                |
| 2                | 49                | 2                | 46                | 2                | 53                | 2                | 66                | 2                | 94                | 2                | 63                |
| 3                | 54                | 3                | 51                | 3                | 58                | 3                | 71                | 3                | 27,00             | 3                | 70                |
| 4                | 59                | 4                | 56                | 4                | 64                | 4                | 76                | 4                | 06                | 4                | 76                |
| 5                | 63                | 5                | 61                | 5                | 69                | 5                | 81                | 5                | 12                | 5                | 83                |
| 6                | 68                | 6                | 66                | 6                | 74                | 6                | 86                | 6                | 17                | 6                | 90                |
| 7                | 73                | 7                | 71                | 7                | 79                | 7                | 91                | 7                | 23                | 7                | 97                |
| 8                | 78                | 8                | 76                | 8                | 84                | 8                | 97                | 8                | 29                | 8                | 31,03             |
| 9                | 83                | 9                | 81                | 9                | 89                | 9                | 24,02             | 9                | 34                | 9                | 10                |

Tabelle IX. Refraktion von Äthylalkohol-Wasser-Mischungen.

1713

| Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% | Skalen-<br>teile | Alkohol<br>Gew.-% |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <b>72,0</b>      | <b>31,17</b>      | <b>78,0</b>      | <b>35,50</b>      | <b>84,0</b>      | <b>40,68</b>      | <b>90,0</b>      | <b>47,02</b>      | <b>96,0</b>      | <b>55,41</b>      | <b>102,0</b>     | <b>69,30</b>      |
| 1                | 24                | 1                | 58                | 1                | 78                | 1                | 14                | 1                | 58                | 1                | 68                |
| 2                | 30                | 2                | 67                | 2                | 87                | 2                | 26                | 2                | 74                | 2                | 70,08             |
| 3                | 37                | 3                | 75                | 3                | 96                | 3                | 38                | 3                | 91                | 3                | 49                |
| 4                | 44                | 4                | 83                | 4                | 41,06             | 4                | 50                | 4                | 56,08             | 4                | 91                |
| 5                | 50                | 5                | 91                | 5                | 15                | 5                | 62                | 5                | 25                | 5                | 71,37             |
| 6                | 57                | 6                | 98                | 6                | 25                | 6                | 75                | 6                | 42                | 6                | 86                |
| 7                | 64                | 7                | 36,06             | 7                | 34                | 7                | 87                | 7                | 60                | 7                | 72,36             |
| 8                | 70                | 8                | 14                | 8                | 44                | 8                | 99                | 8                | 77                | 8                | 90                |
| 9                | 77                | 9                | 22                | 9                | 53                | 9                | 48,12             | 9                | 94                | 9                | 73,48             |
| <b>73,0</b>      | <b>31,84</b>      | <b>79,0</b>      | <b>36,30</b>      | <b>85,0</b>      | <b>41,63</b>      | <b>91,0</b>      | <b>48,24</b>      | <b>97,0</b>      | <b>57,13</b>      | <b>103,0</b>     | <b>74,07</b>      |
| 1                | 91                | 1                | 38                | 1                | 73                | 1                | 37                | 1                | 31                | 1                | 74,68             |
| 2                | 98                | 2                | 46                | 2                | 83                | 2                | 49                | 2                | 49                | 2                | 75,34             |
| 3                | 32,04             | 3                | 54                | 3                | 93                | 3                | 62                | 3                | 67                | 3                | 76,20             |
| 4                | 11                | 4                | 63                | 4                | 42,03             | 4                | 75                | 4                | 85                | 4                | 77,60             |
| 5                | 18                | 5                | 71                | 5                | 13                | 5                | 87                | 5                | 58,04             | 5                | 80,00             |
| 6                | 26                | 6                | 79                | 6                | 23                | 6                | 49,00             | 6                | 23                | 6                | Wendepunkt        |
| 7                | 33                | 7                | 87                | 7                | 33                | 7                | 13                | 7                | 42                | 7                | 103,46            |
| 8                | 40                | 8                | 96                | 8                | 43                | 8                | 26                | 8                | 61                | 8                | 81,78             |
| 9                | 47                | 9                | 37,05             | 9                | 53                | 9                | 39                | 9                | 80                | 9                | 82,69             |
| <b>74,0</b>      | <b>32,54</b>      | <b>80,0</b>      | <b>37,13</b>      | <b>86,0</b>      | <b>42,63</b>      | <b>92,0</b>      | <b>49,52</b>      | <b>98,0</b>      | <b>59,00</b>      |                  |                   |
| 1                | 61                | 1                | 22                | 1                | 73                | 1                | 65                | 1                | 20                | 1                | 95                |
| 2                | 68                | 2                | 30                | 2                | 84                | 2                | 78                | 2                | 40                | 2                | 103,0             |
| 3                | 75                | 3                | 38                | 3                | 94                | 3                | 92                | 3                | 61                | 3                | 84,45             |
| 4                | 82                | 4                | 46                | 4                | 43,04             | 4                | 50,05             | 4                | 81                | 4                | 102,9             |
| 5                | 89                | 5                | 55                | 5                | 14                | 5                | 19                | 5                | 60,02             | 5                | 8                 |
| 6                | 96                | 6                | 63                | 6                | 25                | 6                | 32                | 6                | 23                | 6                | 85,34             |
| 7                | 33,03             | 7                | 71                | 7                | 35                | 7                | 46                | 7                | 45                | 7                | 73                |
| 8                | 10                | 8                | 80                | 8                | 45                | 8                | 60                | 8                | 66                | 8                | 86,11             |
| 9                | 17                | 9                | 88                | 9                | 56                | 9                | 74                | 9                | 89                | 9                | 47                |
| <b>75,0</b>      | <b>33,24</b>      | <b>81,0</b>      | <b>37,97</b>      | <b>87,0</b>      | <b>43,66</b>      | <b>93,0</b>      | <b>50,88</b>      | <b>99,0</b>      | <b>61,10</b>      |                  |                   |
| 1                | 31                | 1                | 38,06             | 1                | 77                | 1                | 51,02             | 1                | 33                | 1                | 80                |
| 2                | 38                | 2                | 14                | 2                | 87                | 2                | 16                | 2                | 55                | 2                | 88,05             |
| 3                | 46                | 3                | 23                | 3                | 98                | 3                | 30                | 3                | 77                | 3                | 102,0             |
| 4                | 53                | 4                | 32                | 4                | 44,08             | 4                | 44                | 4                | 62,00             | 4                | 101,9             |
| 5                | 60                | 5                | 41                | 5                | 19                | 5                | 58                | 5                | 23                | 5                | 8                 |
| 6                | 68                | 6                | 50                | 6                | 30                | 6                | 72                | 6                | 46                | 6                | 85                |
| 7                | 75                | 7                | 59                | 7                | 41                | 7                | 87                | 7                | 69                | 7                | 89,10             |
| 8                | 83                | 8                | 68                | 8                | 52                | 8                | 52,01             | 8                | 93                | 8                | 5                 |
| 9                | 96                | 9                | 76                | 9                | 63                | 9                | 15                | 9                | 63,17             | 9                | 34                |
| <b>76,0</b>      | <b>33,98</b>      | <b>82,0</b>      | <b>38,85</b>      | <b>88,0</b>      | <b>44,74</b>      | <b>94,0</b>      | <b>52,30</b>      | <b>100,0</b>     | <b>63,41</b>      |                  |                   |
| 1                | 34,05             | 1                | 94                | 1                | 85                | 1                | 45                | 1                | 65                | 1                | 86                |
| 2                | 13                | 2                | 39,03             | 2                | 96                | 2                | 59                | 2                | 90                | 2                | 101,0             |
| 3                | 20                | 3                | 11                | 3                | 45,07             | 3                | 74                | 3                | 64,15             | 3                | 100,9             |
| 4                | 28                | 4                | 20                | 4                | 18                | 4                | 89                | 4                | 41                | 4                | 8                 |
| 5                | 35                | 5                | 29                | 5                | 29                | 5                | 53,04             | 5                | 67                | 5                | 91,08             |
| 6                | 43                | 6                | 38                | 6                | 41                | 6                | 19                | 6                | 93                | 6                | 27                |
| 7                | 50                | 7                | 48                | 7                | 52                | 7                | 34                | 7                | 65,20             | 7                | 46                |
| 8                | 58                | 8                | 57                | 8                | 63                | 8                | 50                | 8                | 48                | 8                | 65                |
| 9                | 66                | 9                | 66                | 9                | 75                | 9                | 65                | 9                | 76                | 9                | 83                |
| <b>77,0</b>      | <b>34,73</b>      | <b>83,0</b>      | <b>39,75</b>      | <b>89,0</b>      | <b>45,86</b>      | <b>95,0</b>      | <b>53,81</b>      | <b>101,0</b>     | <b>66,04</b>      |                  |                   |
| 1                | 80                | 1                | 85                | 1                | 97                | 1                | 96                | 1                | 34                | 1                | 92,00             |
| 2                | 88                | 2                | 94                | 2                | 46,09             | 2                | 54,12             | 2                | 63                | 2                | 17                |
| 3                | 96                | 3                | 40,03             | 3                | 20                | 3                | 28                | 3                | 94                | 3                | 8                 |
| 4                | 35,03             | 4                | 12                | 4                | 32                | 4                | 44                | 4                | 67,25             | 4                | 7                 |
| 5                | 11                | 5                | 22                | 5                | 43                | 5                | 60                | 5                | 57                | 5                | 83                |
| 6                | 19                | 6                | 31                | 6                | 55                | 6                | 76                | 6                | 90                | 6                | 98                |
| 7                | 27                | 7                | 40                | 7                | 66                | 7                | 92                | 7                | 68,24             | 7                | 5                 |
| 8                | 35                | 8                | 50                | 8                | 78                | 8                | 55,08             | 8                | 58                | 8                | 4                 |
| 9                | 42                | 9                | 59                | 9                | 90                | 9                | 24                | 9                | 94                | 9                | 3                 |

| Skalenteile | Alkohol Gew.-% | Skalenteile | Alkohol Gew.-% | Skalenteile | Alkohol Gew.-% | Skalenteile | Alkohol Gew.-% | Skalenteile | Alkohol Gew.-% | Skalenteile | Alkohol Gew.-% |
|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| 99,0        | 93,86          | 98,0        | 95,18          | 97,0        | 96,35          | 96,0        | 97,43          | 95,0        | 98,41          | 94,0        | 99,36          |
| 98,9        | 94,00          | 97,9        | 30             | 96,9        | 47             | 95,9        | 53             | 94,9        | 50             | 93,9        | 46             |
| 8           | 14             | 8           | 42             | 8           | 58             | 8           | 63             | 8           | 60             | 8           | 55             |
| 7           | 28             | 7           | 54             | 7           | 69             | 7           | 73             | 7           | 69             | 7           | 65             |
| 6           | 41             | 6           | 67             | 6           | 80             | 6           | 83             | 6           | 79             | 6           | 75             |
| 5           | 54             | 5           | 78             | 5           | 91             | 5           | 93             | 5           | 88             | 5           | 85             |
| 4           | 67             | 4           | 90             | 4           | 97,01          | 4           | 98,03          | 4           | 97             | 4           | 95             |
| 3           | 80             | 3           | 96,01          | 3           | 12             | 3           | 13             | 3           | 99,07          | 93,35       | 100,00         |
| 2           | 93             | 2           | 12             | 2           | 22             | 2           | 22             | 2           | 16             |             |                |
| 1           | 95,05          | 1           | 24             | 1           | 33             | 1           | 32             | 1           | 26             |             |                |

Umrechnungstabelle für Refraktometerablesungen bei 10—30° auf die Normaltemperatur von 17,5°.

| Ablesung bei           | Skalenteile |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                        | (15)        | 20     | (25)   | 30     | 40     | 50     | 60     | 70     | 80     | 90     |
| Skalenteil-Differenzen |             |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 10°                    | — 1,30      | — 1,35 | — 1,40 | — 1,60 | — 2,00 | — 2,75 | — 3,50 | — 4,35 | — 5,45 | — 5,95 |
| 11°                    | 1,15        | 1,20   | 1,25   | 1,45   | 1,80   | 2,40   | 3,10   | 3,80   | 4,70   | 5,30   |
| 12°                    | 0,95        | 1,05   | 1,10   | 1,25   | 1,60   | 2,10   | 2,65   | 3,20   | 3,90   | 4,55   |
| 13°                    | 0,75        | 0,85   | 0,95   | 1,05   | 1,30   | 1,75   | 2,20   | 2,60   | 3,20   | 3,75   |
| 14°                    | 0,60        | 0,70   | 0,80   | 0,85   | 1,05   | 1,40   | 1,75   | 2,05   | 2,50   | 2,95   |
| 15°                    | 0,50        | 0,50   | 0,65   | 0,65   | 0,75   | 1,00   | 1,25   | 1,45   | 1,75   | 2,10   |
| 16°                    | 0,30        | 0,30   | 0,40   | 0,45   | 0,45   | 0,65   | 0,80   | 0,90   | 1,05   | 1,25   |
| 17°                    | 0,10        | 0,10   | 0,15   | 0,20   | 0,20   | 0,20   | 0,25   | 0,30   | 0,35   | 0,40   |
| 17,5°                  | 0,00        | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| 18°                    | + 0,10      | + 0,10 | + 0,15 | + 0,20 | + 0,25 | + 0,20 | + 0,25 | + 0,35 | + 0,40 | + 0,45 |
| 19°                    | 0,30        | 0,30   | 0,35   | 0,45   | 0,60   | 0,65   | 0,80   | 1,05   | 1,15   | 1,30   |
| 20°                    | 0,50        | 0,50   | 0,60   | 0,70   | 1,00   | 1,15   | 1,45   | 1,80   | 2,00   | 2,15   |
| 21°                    | 0,70        | 0,70   | 0,85   | 1,00   | 1,35   | 1,65   | 2,15   | 2,50   | 2,95   |        |
| 22°                    | 0,95        | 0,95   | 1,15   | 1,30   | 1,75   | 2,20   | 2,80   | 3,25   | 3,85   |        |
| 23°                    | 1,20        | 1,25   | 1,35   | 1,60   | 2,15   | 2,75   | 3,45   | 4,00   | 4,80   |        |
| 24°                    | 1,45        | 1,55   | 1,65   | 1,90   | 2,55   | 3,25   | 4,10   | 4,80   | 5,75   |        |
| 25°                    | 1,75        | 1,80   | 1,95   | 2,20   | 2,95   | 3,80   | 4,80   | 5,60   | 6,70   |        |
| 26°                    | 2,00        | 2,10   | 2,30   | 2,60   | 3,40   | 4,35   | 5,50   | 6,45   | 7,65   |        |
| 27°                    | 2,30        | 2,40   | 2,65   | 2,95   | 3,85   | 4,85   | 6,20   | 7,25   | 8,55   |        |
| 28°                    | 2,60        | 2,70   | 2,95   | 3,35   | 4,30   | 5,40   | 6,90   | 8,10   | 9,45   |        |
| 29°                    | 2,90        | 3,10   | 3,35   | 3,75   | 4,80   | 5,95   | 7,60   | 8,95   | 10,35  |        |
| 30°                    | 3,20        | 3,45   | 3,75   | 4,15   | 5,30   | 6,50   | 8,30   | 9,80   | 11,25  |        |

Die zwischen 10 und 17,5° ermittelten Skalenteil-Differenzen sind von den Ablesungen bei diesen Temperaturen abzuziehen, die zwischen 17,5 und 30° ermittelten Skalenteil-Differenzen entsprechend hinzuzuzählen.

Bei der Verwendung der Umrechnungstabelle muß sowohl die Skalenteil-Differenz als auch die Temperatur-Differenz interpoliert werden.

Beispiel: Gefunden 66,80 Skalenteile bei 27,7°.

a) Temperatur-Interpolation.

|                                     | Skalenteile 60  | Skalenteile 70    |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------|
| Skalenteil-Differenz 28—27° je 1° = | 0,7             | 0,85              |
| desgl. für 0,7° =                   | 0,5             | 0,6               |
| desgl. bei 27,7° =                  | 6,2 + 0,5 = 6,7 | 7,25 + 0,6 = 7,85 |

## b) Skalenteil-Interpolation bei 27,7°.

Skalenteil-Differenz 70—60 Skalenteile = 7,85 — 6,7 = 1,15, also für 1° = 0,115, also für 6,8° = 0,115 × 6,8 = 0,78 = 0,80;

also Skalenteil-Differenz für 66,8 = 6,70 + 0,80 = 7,5 bei 27,7°,

also Wert für die 17,5°-Tabelle: 66,80 + 7,5 = 74,3, entsprechend 32,75 Gew.-% Alkohol.

Tabelle X. Atomgewichte der Elemente<sup>1</sup>.

|                       |    |        |                        |    |        |
|-----------------------|----|--------|------------------------|----|--------|
| Aluminium . . . . .   | Al | 26,97  | Natrium . . . . .      | Na | 23,00  |
| Antimon . . . . .     | Sb | 121,76 | Neodymium . . . . .    | Nd | 144,27 |
| Argon . . . . .       | Ar | 39,94  | Neon . . . . .         | Ne | 20,18  |
| Arsen . . . . .       | As | 74,91  | Nickel . . . . .       | Ni | 58,69  |
| Barium . . . . .      | Ba | 137,36 | Niobium . . . . .      | Nb | 92,91  |
| Beryllium . . . . .   | Be | 9,02   | Osmium . . . . .       | Os | 191,5  |
| Blei . . . . .        | Pb | 207,22 | Palladium . . . . .    | Pd | 106,7  |
| Bor . . . . .         | B  | 10,82  | Phosphor . . . . .     | P  | 31,02  |
| Brom . . . . .        | Br | 79,92  | Platin . . . . .       | Pt | 195,23 |
| Cadmium . . . . .     | Cd | 112,41 | Praseodymium . . . . . | Pr | 140,92 |
| Caesium . . . . .     | Cs | 132,91 | Quecksilber . . . . .  | Hg | 200,61 |
| Calcium . . . . .     | Ca | 40,08  | Radium . . . . .       | Ra | 225,97 |
| Cassiopeium . . . . . | Cp | 175,0  | Rhenium . . . . .      | Rh | 186,31 |
| Cerium . . . . .      | Ce | 140,13 | Rhodium . . . . .      | Rh | 102,91 |
| Chlor . . . . .       | Cl | 35,46  | Rubidium . . . . .     | Rb | 85,44  |
| Chrom . . . . .       | Cr | 52,01  | Ruthenium . . . . .    | Ru | 101,7  |
| Dysprosium . . . . .  | Dy | 162,46 | Samarium . . . . .     | Sm | 150,43 |
| Eisen . . . . .       | Fe | 55,84  | Sauerstoff . . . . .   | O  | 16,00  |
| Emanation . . . . .   | Em | 222    | Scandium . . . . .     | Sc | 45,10  |
| Erbium . . . . .      | Er | 167,64 | Schwefel . . . . .     | S  | 32,06  |
| Europium . . . . .    | Eu | 152,00 | Selen . . . . .        | Se | 78,96  |
| Fluor . . . . .       | F  | 19,0   | Silber . . . . .       | Ag | 107,88 |
| Gadolinium . . . . .  | Gd | 157,3  | Silicium . . . . .     | Si | 28,06  |
| Gallium . . . . .     | Ga | 69,72  | Stickstoff . . . . .   | N  | 14,01  |
| Germanium . . . . .   | Ge | 72,60  | Strontium . . . . .    | Sr | 87,63  |
| Gold . . . . .        | Au | 197,2  | Tantal . . . . .       | Ta | 181,4  |
| Hafnium . . . . .     | Hf | 178,6  | Tellur . . . . .       | Te | 127,61 |
| Helium . . . . .      | He | 4,05   | Terbium . . . . .      | Tb | 159,2  |
| Holmium . . . . .     | Ho | 163,5  | Thallium . . . . .     | Tl | 204,39 |
| Indium . . . . .      | In | 114,76 | Thorium . . . . .      | Th | 232,12 |
| Iridium . . . . .     | Ir | 193,1  | Thulium . . . . .      | Tu | 169,4  |
| Jod . . . . .         | J  | 126,92 | Titan . . . . .        | Ti | 47,90  |
| Kalium . . . . .      | K  | 39,10  | Uran . . . . .         | U  | 238,14 |
| Kobalt . . . . .      | Co | 58,94  | Vanadium . . . . .     | V  | 50,95  |
| Kohlenstoff . . . . . | C  | 12,00  | Wasserstoff . . . . .  | H  | 1,008  |
| Krypton . . . . .     | Kr | 83,7   | Wismut . . . . .       | Bi | 209,00 |
| Kupfer . . . . .      | Cu | 63,57  | Wolfram . . . . .      | W  | 184,0  |
| Lanthan . . . . .     | La | 138,9  | Xenon . . . . .        | X  | 131,3  |
| Lithium . . . . .     | Li | 6,97   | Ytterbium . . . . .    | Yb | 173,04 |
| Lutetium . . . . .    | Lu | 174    | Yttrium . . . . .      | Y  | 88,93  |
| Magnesium . . . . .   | Mg | 24,32  | Zink . . . . .         | Zn | 65,38  |
| Mangan . . . . .      | Mn | 54,93  | Zinn . . . . .         | Sn | 118,70 |
| Molybdän . . . . .    | Mo | 96,0   | Zirkonium . . . . .    | Zr | 91,22  |

<sup>1</sup> Nach O. HAHN: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1935, 68, 1.

## Sachverzeichnis.

- Absorptionsphotometrie, Anwendungen 353.  
 — Gesetze 343.  
 Absorptionsspektren 299.  
 — Aussehen 336.  
 — Darstellung 351.  
 — Einteilung 300.  
 — qualitative Beobachtung 334.  
 — Veränderlichkeit 338.  
 Absorptionsspektroskopie, Grenzabsorption 336.  
 — Grundlagen 333.  
 — qualitative 340.  
 — quantitative siehe Absorptionsphotometrie.  
 — Spektrum und Farbe 333.  
 Acetaldehyd, Bestimmung 1047.  
 — Eigenschaften 1044.  
 — Nachweis 1045.  
 — — neben Formaldehyd 1067.  
 — und Aceton, Bestimmung nebeneinander 1068.  
 — Aceton und Formaldehyd, Nachweis und Bestimmung nebeneinander 1070.  
 — Äthylalkohol und Aceton, Bestimmung nebeneinander 1070.  
 — und Formaldehyd, Bestimmung nebeneinander 1067.  
 Aceton, Bestimmung 1062.  
 — Eigenschaften 1058.  
 — Nachweis 1059.  
 — und Acetaldehyd, Bestimmung nebeneinander 1068.  
 — — und Äthylalkohol, Bestimmung nebeneinander 1070.  
 — — und Formaldehyd, Nachweis und Bestimmung nebeneinander 1070.  
 — und Formaldehyd, Bestimmung nebeneinander 1067.  
 Acetophenon 1311.  
 Aconitin 1344, 1364.  
 Adalin 1370.  
 Adrenalin 1374.  
 Adsorptionserscheinungen 57, 59, 66.  
 Adsorptionsfilter 30.  
 Äpfelsäure, Bestimmung 1106, 1161, 1164.  
 — Eigenschaften 1104.  
 — Nachweis 1105, 1151.  
 Äquivalenzpunkt 196.  
 Äther, Nachweis 1311.  
 Äthylalkohol, Bestimmung 1008, 1303.  
 — — durch Aussalzung 1012.  
 — — im Blut 1304.  
 — — aus der Dichte 1008.  
 — — als Jodoform 1011.  
 — — durch Oxydation 1011.  
 — — durch Refraktion 1011.  
 — — durch sonstige Verfahren 1013.  
 — Acetaldehyd und Aceton, Bestimmung nebeneinander 1070.  
 — Eigenschaften und Handelsorten 1004.  
 — Nachweis 1007, 1303.  
 — Reinheitsanforderungen 1005.  
 — vergällter Nachweis 1006.  
 — siehe auch Alkohol.  
 Äthylenchlorid 1299.  
 Äthylidenchlorid 1299.  
 Agglutinine 672.  
 Alanin, Nachweis 626.  
 Alcannafarbstoff 1183, 1184, 1204.  
 Aldehyde, Bestimmung 1031.  
 — Nachweis 1023.  
 — — Fällungsreaktionen 1025.  
 — — Farbenreaktionen 1030.  
 — — Reduktionsreaktionen 1024.  
 — neben Ketonen, Nachweis 1066.  
 — siehe auch Form-, Acetaldehyd usw.  
 Aldehydmutase der Hefe, Bestimmung und Darstellung 795.  
 Aldehydrasen 795, 812.  
 Alkalichloride, Vergiftungen dadurch 1426.  
 Alkalihydroxyde und -carbonate 1422.  
 Alkaloide, Ätherausschüttelung in alkalischer Lösung 1329.  
 — — in saurer Lösung 1328.  
 — Bestimmung 1340.  
 — Eigenschaften 1339.  
 — Nachweis, allgemeine Verfahren 1325.  
 — Reaktionen 1364.  
 — — allgemeine 1326.  
 — Reinigung 1323.  
 — Vorprüfung der sauren wäßrigen Lösung 1327.  
 Alkohol, Pyridinbasen, Nachweis darin 1006.  
 — vergällter, Nachweis 1006.  
 — siehe auch Methyl-, Äthyl-, Propylalkohol usw.  
 Alkohole, Bestimmung 983.  
 — — als Ester 983.  
 — — als Jodide 988.  
 — — durch Oxydation 989.  
 — Nachweis 977.  
 — — durch die Ester 977.  
 — — Farbenreaktionen 981.  
 Alkoholdehydrasen 812.  
 Allional 1368.  
 Alternaria 1658.  
 Aluminiumbestimmung 1223, 1228.  
 Amaranth, Nachweis 1191.  
 Amboceptor 673.  
 Amboceptorbindung 703.  
 Ameisensäure, Bestimmung 1077, 1317.  
 — — neben Essigsäure 1160.  
 — Eigenschaften 1075.  
 — Nachweis 1076, 1317.  
 — — neben Oxal- und Weinsäure 1148.  
 Amidasen, Bestimmung 781.  
 Amine, Alkylamine, Nachweis 640.  
 — Bestimmung neben Ammoniak 641.  
 — Nachweis neben Ammoniak 640.  
 — — und Bestimmung 636.  
 — primäre, Nachweis 638.  
 — sekundäre, Nachweis 638.  
 — tertiäre, Nachweis 638.  
 Aminobenzol 1318.  
 Aminosäuren, Bestimmung 617.

- Aminosäuren, heterocyclische, Nachweis und Bestimmung 632.  
 — Nachweis 615.  
 Ammoniak, Bestimmung 643, 1421.  
 — — Ausblaseverfahren 646.  
 — — Destillationsverfahren 643.  
 — — Hypobromitverfahren 647.  
 — — mit NESSLERS Reagens 649.  
 — Destillationsapparatur 579.  
 — Nachweis 642, 1421.  
 Amylalkohole, Bestimmung 1022.  
 — Eigenschaften 1020.  
 — Nachweis 1021, 1307.  
 Amylasen, Bestimmung 732.  
 — Gewinnung und Reinigung 741.  
 Amylnitrit 1318.  
 Anaphylaxieversuch 702.  
 Anastomosen 1625.  
 Aniline 1318, 1319, 1372.  
 Antifebrin 1370.  
 Antigene 670.  
 Antikörper 670.  
 — heterogenetische 675.  
 Antimon, Nachweis und Bestimmung 1406.  
 Antipyrin 1371.  
 Antisera, Herstellung 681.  
 Antitoxine 671.  
 Apomorphin 1349, 1356, 1364.  
 Apothezien 1628.  
 Apozymase, Bestimmung und Darstellung 793.  
 Araban, Bestimmung siehe Pentosane, Bestimmung.  
 Arabinose, Nachweis 857.  
 Aräometer 13.  
 Arginase, Bestimmung 785.  
 Arginin, Bestimmung 630.  
 — Nachweis 630.  
 Arsen, Bestimmung 1400.  
 — — durch Hydrierung 595.  
 — Nachweis 568, 1389.  
 Asche, Alkalitätsbestimmung 1215.  
 — Bestimmung 1209.  
 — Kohlensäurebestimmung 1211.  
 — Phosphate, Bestimmung 1219.  
 — Reinasche, Bestimmung 1211.  
 — Veraschung mit alkalischen Zusätzen 1220.  
 Ascomyceten 1639.  
 Ascosporen 1627.  
 Ascusfrüchte 1628.  
 Asparagin, Nachweis 630.  
 Asparaginase, Darstellung 787.  
 Asparaginsäure, Nachweis 629.  
 Aspergillus 1644.  
 Atropin 1359.  
 Aurantiagelb, Nachweis 1197.  
 Aurin, Nachweis 1198.  
 Ausgleichspolynome 1448.  
 Bakterien der Lebensmittel 1623.  
 — Kulturen, Massenkulturen 1607.  
 — — Riesenkulturen 1604.  
 — — Stichkulturen 1607.  
 — — Strichkulturen 1607.  
 — Untersuchung 1605.  
 Bakterienpräparate, Herstellung 523.  
 Bakteriophagie 1617.  
 Barium, Nachweis und Bestimmung 1420.  
 Basidien 1628.  
 Basidiomyceten 1652.  
 Basidiosporen 1628.  
 Bathometrie siehe Stufenmessung.  
 Benzaldehyd, Bestimmung 1049.  
 — Eigenschaften 1048.  
 — Nachweis 1048.  
 Benzaldehydcyanhydrin, Bestimmung 1291.  
 Benzoesäure, Bestimmung 1128, 1168.  
 — Eigenschaften 1125.  
 — Nachweis 1126, 1152.  
 Benzol 1321.  
 Benzophenol, Bestimmung 1313.  
 — Nachweis 1312.  
 Beobachtungsfehler 1438.  
 Berberin 1345, 1364.  
 Bernsteinsäure, Bestimmung 1096, 1161, 1164.  
 — Eigenschaften 1095.  
 — Nachweis 1095.  
 Bindungsvermögen 200.  
 Biologische Methoden 1457.  
 — Oxydation 801.  
 Blasendruck, maximaler 64.  
 Blausäure, Bestimmung 1291.  
 — Nachweis 1288.  
 — Vorproben 1287.  
 Blei, Nachweis und Bestimmung 1411.  
 Blut, Gerinnung 771.  
 — serologische Untersuchung 685.  
 Borate bei Vergiftungen 1427.  
 Borsäure, Bestimmung 1265.  
 — Eigenschaften 1264.  
 — Nachweis 1265.  
 Botrytis cinerea 1652.  
 Brechungsindex, Temperatureinfluß 285.  
 Brenztraubensäure 1144.  
 Bromal 1299.  
 Bromoform, Nachweis und Bestimmung 1297.  
 Bromural 1370.  
 Brucein 1362, 1364.  
 Brutschränke 1557.  
 Burbonal 1050.  
 Butter-Refraktometer 271.  
 Buttersäure, Bestimmung 1088.  
 — Eigenschaften 1085.  
 — Nachweis 1086.  
 Buttersäurebakterien 1624.  
 Butylalkohol, Bestimmung 1019.  
 — Eigenschaften 1019.  
 Cadmium, Nachweis und Bestimmung 1418.  
 Calcium, Bestimmung 1225, 1232.  
 Calciumcyanamid 1292.  
 Calorimeter 125.  
 Canidin 1346.  
 Cantharidin, Nachweis 1332.  
 Capillaranalyse 57, 59, 70.  
 — Anwendung 74.  
 — Auswertung 72.  
 — Methodik 70.  
 Capillarimetrie 62.  
 Capillaritätserscheinungen 59.  
 Caramel, Nachweis 1188.  
 Carbohydrasen, Bestimmung 727.  
 Carboligase, Bestimmung 800.  
 Carbonsäure, Bestimmung 1313.  
 — Nachweis 1312.  
 Carboxylase, Bestimmung 798.  
 Carvacrol 1316.  
 Casein, serologische Prüfung 692.  
 Cellulase, Gewinnung und Reinigung 744.  
 Cellulose, Bestimmung durch Hydrolyse 947.  
 — — in der Rohfaser 945.  
 Cerealien, serologische Prüfung 699.  
 Chinin 1363, 1366.  
 Chlamydosporen 1631, 1635.  
 Chlor, Bestimmung 1240.  
 Chloralhydrat, Nachweis und Bestimmung 1297.  
 Chlorbenzoesäure (p), Bestimmung 1134.  
 — Eigenschaften 1133.  
 — Nachweis 1134, 1153.  
 Chlorcyan 1292.  
 Chloroform, Bestimmung 1296.  
 — Nachweis 1295, 1299.  
 Chlorophyll, Nachweis und Bestimmung 1187, 1204.  
 Chlorophyllase, Bestimmung 725.

- Chlorsäure, Nachweis und Bestimmung 1241.  
 Cholin 1379.  
 Chrom, Nachweis und Bestimmung 1419.  
 Citromyces 1649.  
 Citronensäure, Bestimmung 1119, 1161, 1164.  
 — Eigenschaften 1115.  
 — Nachweis 1116, 1151, 1152.  
 Cladosporium 1651, 1658.  
 Cocain 1358, 1372.  
 Codein 1349, 1357, 1364, 1366.  
 Colchicin 1344, 1365.  
 Coloquinten 1333.  
 Colorimeter 404.  
 Colorimetrie 403.  
 Coloriskop 205.  
 Conidien 1628.  
 Coniin, Nachweis 1341.  
 Corallin, Nachweis 1199.  
 Cotarnin 1350, 1365.  
 Co-Zymase, Bestimmung und Darstellung 792.  
 Curarin 1363.  
 Curcumafarbstoff 1186.  
 Curral 1368.  
 Cutin, Bestimmung in der Rohfaser 945.  
 Cyankohlensäuremethylester 1292.  
 Cyclamin 1336.  
 Cystein, Bestimmung 628.  
 — Nachweis 628.  
 Cystin, Bestimmung 629.  
 — Nachweis 628.  
 Cytisin 1357, 1364.  
  
**Darmbakterien** 1624.  
 Dehydrase, Bestimmung 810.  
 — und Dehydrogenase 795.  
 — Purindehydrase 814.  
 Delphinin 1345.  
 Dematium pullulans 1662.  
 Densimeter siehe Aräometer.  
 Dextrine, Bestimmung 910.  
 — Nachweis 908.  
 Diacetyl, Bestimmung 1065.  
 — Eigenschaften 1064.  
 — Nachweis 1064.  
 Dialysatoren 48.  
 Dialyse 41.  
 — Apparate dafür 48.  
 — Diaphragmen dafür 45.  
 — Elektrodialyse siehe Elektrodialyse.  
 Diamino-monocarbonsäuren, Nachweis und Bestimmung 630.  
 Diaphanometer 415.  
 Diaphragmen für Dialyse 45.  
 Dichte siehe Spezifisches Gewicht.  
 Dicodid 1350.  
 Dicyan 1292.  
 Diffusion 41.  
 Digitalin 1334.  
 Digitonin 1334, 1336.  
 Digitoxin 1334.  
 Dilatometer 8.  
 Dionin 1350, 1357, 1366.  
 Disaccharide, Bestimmung 883.  
 Drehung, spezifische chemischer Verbindungen 399.  
 — — und molekulare 362.  
 Eigelb, serologische Prüfung 695.  
 Eisen, Bestimmung 1223, 1226.  
 Eisenbakterien 1625.  
 Eiweiß, serologische Prüfung 695.  
 Elektroden, Calomelektroden 151.  
 — Chinhydronelektroden 152.  
 — Meßelektroden 149.  
 — -Potentiale 224.  
 — Wasserstoffelektroden 149.  
 Elektrodialyse 43.  
 — Apparate dafür 54.  
 Elementaranalyse 565.  
 — nach DENNSTEDT 588.  
 — Mikroanalyse 595.  
 — qualitative 565.  
 — quantitative 568.  
 — Verbrennungsofen 570.  
 Emetin 1364.  
 Emissionsspektren 301.  
 Emissionsspektroskopie, Anwendungen 322, 332.  
 — Grenzen der Spektralanalyse 331.  
 — Mikromethoden 329.  
 — qualitative 324.  
 — quantitative 327.  
 Emulsin, Bestimmung 730.  
 Enterokinase, Darstellung 765.  
 Entfärben von Flüssigkeiten 69.  
 Enzyme, Adsorptionsmittel 712.  
 — Bestimmung, Grundlagen 705.  
 — des Energiestoffwechsels 789.  
 — Erzeugung durch Pilze 1608.  
 — der Gärung 789.  
 — hydrolytische 714.  
 — katheptische, Bestimmung 755.  
 — kohlenhydratspaltende, Bestimmung 726.  
 — Nachweis 1608.  
 — — caseinspaltende 1609.  
 — — elastinspaltende 1609.  
 — — fettspaltende 1609.  
 Enzyme, Nachweis, Gärungsenzyme 1608.  
 — — stärkespaltende 1609.  
 — — Nachweisverfahren 1608.  
 — — auxanographisches 1607.  
 — — Diffusionsverfahren 1608.  
 — — pektinspaltende, Gewinnung und Reinigung 745.  
 — — Reinigung 705, 710.  
 Epinephrin 1374.  
 Ergotinin 1337.  
 Eseridin 1358.  
 Essigsäure, Bestimmung 1084.  
 — — neben Ameisensäure 1160.  
 — — neben Buttersäure 1157.  
 — — Eigenschaften 1081.  
 — — Nachweis 1082, 1317.  
 Essigsäureanhydrid, Bestimmung 1085.  
 — — Nachweis 1083.  
 Essigsäurebakterien 1624.  
 Esterasen, Bestimmung 723.  
 Eukodal 1351, 1357, 1364.  
 Eumyceten 1625.  
 — Untersuchungen 1600.  
 Euphorin 1364.  
 Euporphin 1349, 1356.  
 Exsiccatoren 546.  
 Extraktbestimmung 836.  
 — aus der Dichte 837.  
 — durch Lichtbrechung 843.  
 — durch Wägung 836.  
  
**Farblehre von OSTWALD** 424.  
 Farbmeßmethode 429.  
 Farbstoffe, Gruppennachweis 1178.  
 — — Ausfärbverfahren 1178.  
 — — Ausschüttelung 1180.  
 — — Bleiessigfällung 1181.  
 — — Leitfähigkeit 1182.  
 — — Quecksilberoxydbehandlung 1181.  
 — künstliche, Absorptionsspektren 1205, 1207.  
 — — für Lebensmittel 1190.  
 — — — Nachweis 1189, 1191.  
 — — — Analysengang 1196.  
 — — — in faulenden Lebensmitteln 1200.  
 — — Verhalten gegen Säuren und Alkalien 1192.  
 — — Nachweis, spektroskopischer 1200.  
 — natürliche, Absorptionsspektren 1204, 1207.  
 — — — Nachweis 1182.  
 — — — gelbe 1184.  
 — — — grüne 1187.  
 — — — rote 1183.

- Farbstoffbakterien 1624.  
 Farbsysteme 422.  
 Farbtheorien 422.  
 Farbtonmessung 419.  
 Fäulnisbakterien 1624.  
 Feste Stoffe, Spezifisches Gewicht, Bestimmung 4.  
 — — Volumenbestimmung 4.  
 Fett, Nachweis 825.  
 Fette, serologische Untersuchung 692.  
 Fettbestimmung 826.  
 — nach GROSSFELD 829.  
 — nach SOXHLET 826.  
 — sonstige Verfahren 832.  
 Filterkerzen 1565.  
 Fleisch, serologische Untersuchung 688, 691.  
 Fluor, Bestimmung 1246.  
 — Nachweis 1246.  
 Fluoreszenzanalyse 450.  
 — Apparatur 455.  
 — Anwendung 458.  
 — Ergebnisse 462.  
 Fluorometrie 450.  
 Flüssigkeiten, Spezifisches Gewicht, Bestimmung 7.  
 — Volumenbestimmung 7.  
 Formaldehyd 1310.  
 — Bestimmung 1039.  
 — Eigenschaften 1035.  
 — Nachweis 1036, 1308.  
 — — neben Acetaldehyd 1067.  
 — — neben Hexamethylentetramin 1066.  
 — und Acetaldehyd, Bestimmung nebeneinander 1067.  
 — — und Aceton, Nachweis und Bestimmung nebeneinander 1070.  
 — und Aceton, Bestimmung nebeneinander 1067.  
 Fructosane, Bestimmung neben Saccharose 898.  
 Fructose, Bestimmung 892.  
 — Farbenreaktionen 852.  
 — Nachweis 849.  
 Fructosidase, Gewinnung und Reinigung 734.  
 Fumarsäure 1142.  
 Fungi imperfecti 1657.  
 Furanaldehyde, Bestimmung 1057.  
 — Eigenschaften 1055.  
 — Nachweis 1055.  
 — s. auch Furfurol.  
 Furfurol, Bestimmung 928, 1057.  
 — Eigenschaften 1055.  
 — Nachweis 1055.  
 Furol s. Furfurol.  
 Furolcarbinol s. Oxymethylfurfurol.
- Fusarium 1658.  
 Fusicladium 1658.
- Gärkölbchen nach EINHORN 1612.  
 Gärung, alkoholische, Magnesiumwirkung 796.  
 — — Messung 790.  
 — Phosphorylierung 796.  
 Gärungsformen nach NEUBERG 798.  
 Galaktose, Nachweis 849, 859.  
 Galaktosidase, Bestimmung 731.  
 — Gewinnung und Reinigung 741.  
 Galakturonsäure, Bestimmung 955.  
 — Nachweis 955.  
 Gallotannin s. Tannin.  
 Gallusgerbsäure s. Tannin.  
 Gallussäure, Eigenschaften 1169.  
 Gase, Spezifisches Gewicht, Bestimmung 15.  
 Gefrierpunktsbestimmung, Allgemeines 111.  
 — Anwendung 113.  
 — Apparate 114.  
 — Ausführung 117.  
 GEISLERSche Röhren 318.  
 Gemmen 1631.  
 Gerbsäure s. Tannin.  
 Gerbstoffe, Bestimmung 1174.  
 — Eigenschaften 1169.  
 — Nachweis 1170.  
 Gesetzmäßigkeiten, Ableitung aus Untersuchungsergebnissen 1443.  
 GIBBSches Dreieck 291.  
 Gifte, anorganische 1380.  
 — Ausmittelung, allgemeines 1273.  
 — flüchtige 1277.  
 — metallische, Analysengang 1385.  
 — organische, Untersuchungsengang 1321.  
 — Vorproben 1276.  
 Giftgase 1375.  
 Githagin 1336.  
 Gloeosporium 1658.  
 Glucose, Bestimmung durch Reduktion nach MEISSL und ALLIHN 862.  
 — — neben Fructose 890, 893, 895.  
 — Nachweis 848.  
 — Fructose, Saccharose, Dextrin und Fructosane, Bestimmung nebeneinander 895.  
 Gluco-Saccharasen, Gewinnung und Reinigung 738.
- Glucosidasen, Gewinnung und Reinigung 738, 740.  
 Glucoside, Reaktionen 1333.  
 — Untersuchung 959.  
 Glucuronsäure s. Galakturonsäure.  
 Glutamin, Nachweis 630.  
 Glutaminsäure, Nachweis 629.  
 Glykokoll, Bestimmung 626.  
 — Nachweis 626.  
 Glykolsäure 1143.  
 Glykolyse und Atmung, Messung 801.  
 Glyoxalsäure 1143.  
 Grenzflächen, Vorgänge daran 57.  
 Grenzflächenanspannung, Messungsmethoden 61.  
 Grenzzahlen, Zuverlässigkeit 1441.  
 Guajacol 1316.  
 Gummigutt 1333.  
 Gummistoffe, Untersuchung 959.
- Hämolyse 673.  
 — durch Saponine 1336.  
 Hämolytisches System 701.  
 Halogene, Bestimmung nach CARIUS 582.  
 — — nach DENNSTEDT 591.  
 — — nach LIEBIG 583.  
 — — TER MEULEN und HESLINGA 584.  
 — — Mikrobestimmung 599.  
 — — in organischen Stoffen 582.  
 — — nach PRINGSHEIM 584.  
 — freie 1425.  
 — Nachweis 567.  
 Halogenide bei Vergiftungen 426.  
 Hausschwamm 1653.  
 Hefe, Aldehydmutase, Bestimmung und Darstellung 795.  
 — Kugelhefe 1635.  
 — Proteasen, Gewinnung 773.  
 — Trockenhefe, Darstellung 791.  
 Hefepilze 1640.  
 Hefepreßsaft, Darstellung 791.  
 Heidelbeerenfarbstoff 1184, 1204.  
 Heliotropin s. Piperonal.  
 Helminthosporium 1658.  
 Hemiexosane 936.  
 Hemipentosane 936.  
 Heroin 1349, 1356, 1365, 1366.  
 Heubacillen 1623.  
 Hexamethylentetramin, Eigenschaften 1043.  
 — Nachweis und Bestimmung 1044.  
 Hexosane, Einteilung und Bestimmung 936.



- Hexosane, Hemihexosane 936.  
— Protohexosane 936.  
Hexosen, Bestimmung 860.  
— Nachweis 846.  
— — Fructose 849.  
— — Galaktose 849.  
— — Glucose 848.  
— — Mannose 850.  
— — nebeneinander 850.  
— — — Fructose neben anderen Sacchariden 851.  
— — — Galaktose neben anderen Sacchariden 854.  
— — — Glucose neben anderen Sacchariden 850.
- Hexosephosphate, Darstellung 796.
- Hexosidasen, Gewinnung und Reinigung 734.
- Himbeerfarbstoff 1184, 1204.
- Histidin, Bestimmung 633.  
— Nachweis 632.
- Histozym, Bestimmung 781.
- Hollunderbeerenfarbstoff 1184, 1204.
- Homotropin 1361.
- Honig, serologische Prüfung 696.
- Hydrastin 1345, 1364.  
Hydrastinin 1364.  
Hydrostatische Waage 6, 10.
- Hymenium 1629.
- Hyoscyamin 1360.  
Hyponon 1311.
- Indikatoren, Anwendungsgebiete 183.  
— Arten 179.  
— Begriff 174.  
— Einflüsse darauf 182.  
— Farbumschläge 181.  
— Hauptgruppen 184.  
— Übersicht 194.  
— Umschlagsgrad, Säurestufe, Halbwertstufe 176.
- Indolnachweis 1615.
- Inosit, Nachweis und Bestimmung 973.
- Inositphosphorsäure, Nachweis und Bestimmung 974.
- Interferometrie 293.
- Interpolationsformeln für Untersuchungsergebnisse 1444.
- Invertzucker, Bestimmung durch Reduktion nach MEISSL 862.
- Ionograph, Stato-Ionograph 147.
- Ionometer 143.
- Ionoskop 146.
- Isobutylalkohol, Nachweis 1020.
- Isoleucin, Nachweis 627.
- Isopropylalkohol, Bestimmung 1018.  
— Nachweis 1015, 1307.
- Ixometer 28.
- Jervin 1343.
- Jod, Bestimmung 1242.  
— Mikrobestimmung 600.
- Jodoform, Nachweis und Bestimmung 1297.
- Johannisbeerenfarbstoff 1184, 1204.
- Kahmhafen 1642.
- Kalium, Bestimmung 1225, 1234.
- Kampfstoffe 1375.
- Kartoffelbacillen 1623.
- Kartoffelwaage von REIMANN 6.
- Katalase, Bestimmung und Darstellung 818.
- Kathepsin, Bestimmung 755.
- Kaviar, serologische Prüfung 696.
- Keimfreimachung 1561.
- Keimgemische, Untersuchung 1597.
- Keimzählung 1592.
- Keratomalacie 1494.
- Kermesbeerenfarbstoff 1183, 1184.
- Ketone, Nachweis und Bestimmung 1058.  
— neben Aldehyden, Nachweis 1066.
- Kieselfluorwasserstoffsäure, Nachweis und Bestimmung 1250.
- Kirschenfarbstoff 1184, 1204.
- Köpfchenschimmel 1633.
- Kohlenhydrate 835.  
— Vergärung 1612.
- Kohlenoxyd, Bestimmung 1431.  
— Nachweis 1429.
- Kohlensäure, Bestimmung in Aschen 1211.  
— — in Räumen 1422.
- Kohlenstoff, Bestimmung 568.  
— — Mikrobestimmung 596.  
— — auf nassem Wege 593.  
— Nachweis 565.
- Komparatormethode 165.
- Komplement-Ablenkung 700.
- Komplemente 673.
- Koremien 1630.
- Korrelationsmethode zum Vergleich natürlicher Funktionen 1452.
- Krapffarbstoffe 1183.
- Kreosot 1316.
- Kresole, Nachweis 1315.
- Kryoskopie 111.
- Kupfer, Nachweis und Bestimmung 1417.
- Kurven, Glättung 1448.
- Labwirkung, Bestimmung 759.
- Lactose, Bestimmung 890.  
— — durch Reduktion nach SOXHLET 863.  
— — neben anderen Zuckern 902.  
— Nachweis 858.
- Lactotest 693.
- Lävulinsäure 1145.
- Leguminosen, serologische Prüfung 699.
- Leitfähigkeit, elektrolytische, Anwendbarkeit 254.  
— — Grundlagen 233.  
— — Meßmethode 237.  
— — Messungsergebnisse 257.
- Leitfähigkeitsanalyse 259.
- Leitfähigkeitsgefäße 249.
- Leitfähigkeitstitration 256.
- Leuchtbakterien 1625.
- Leucin, Nachweis 626.
- Lichenase, Gewinnung und Reinigung 744.
- Lichtgrün, Nachweis 1191.
- Lignin, Bestimmung 946.  
— — in der Rohfaser 945.
- Linsen, optische 463.  
— — Brennpunkt 464.  
— — chromatische Aberration 465.  
— — sphärische Aberration 466.
- Lipasen, Bestimmung 715.  
— — gasanalytische 719.  
— — stalagmometrische 717.  
— — titrimetrische 715.  
— Gewinnung und Reinigung 720.
- Lobelin 1365.
- Löslichkeit, Begriff 77.
- Löslichkeitsbestimmung 78.  
— gesättigte Lösungen, Herstellung 83.  
— Pipetten dafür 81.  
— Schüttelapparate 80.
- Löslichkeitskurven 78.
- Lösungen, gesättigte, Herstellung 83.
- Luminal 1368.
- Luminescenzanalyse 439.  
— qualitative 448.  
— quantitative 450.
- Luminescenzapparate 440.
- Luminescenz-Mikroskop 493.
- Lupen 482.
- Lysin, Nachweis 632.
- Magnesium, Bestimmung 225, 1233.
- Maleinsäure 1142.

- Malomalsäure 1104.  
 Malonsäure 1142.  
 Maltase, Bestimmung 729.  
 — Gewinnung und Reinigung 738.  
 Maltol 1135.  
 Maltose, Bestimmung 890.  
 — — neben Glucose und Dextrin 900.  
 — — neben Saccharose und Invertzucker 901.  
 — — durch Reduktion nach WEIN 862.  
 Malvenblütenfarbstoff 1183, 1204.  
 Mangan, Bestimmung 1225, 1231.  
 Mannit, Nachweis und Bestimmung 963.  
 Mannose, Nachweis 850.  
 Martiusgelb 1197, 1367.  
 Marzipan, serologische Prüfung 698.  
 Maus, Zucht für Vitaminversuche 1480.  
 Meerschweinchen, Zucht für Vitaminversuche 1481.  
 Mekonin 1348.  
 Mekonsäure 1347.  
 Melezitose, Nachweis 859.  
 Merulius lacrymans 1653.  
 Messungen, Genauigkeit 1438.  
 Metanilgelb, Nachweis 1197.  
 Methylalkohol, Äthylalkohol-nachweis darin 998.  
 — Bestimmung 993, 1302.  
 — — aus der Dichte 994.  
 — — durch Oxydation 996.  
 — — durch Refraktion 994.  
 — — nach REIF 994.  
 — Eigenschaften 990.  
 — Nachweis 990, 1300.  
 — und Äthylalkohol, Bestimmung nebeneinander 999.  
 — — — durch Elementaranalyse 1002.  
 — — — durch Oxydationsverfahren 1002.  
 — — — refraktometrisch-ärometrische 999.  
 Methylamine, Nachweis 638.  
 Methylenchlorid 1299.  
 Methylfurfurol, Bestimmung 1057.  
 — Eigenschaften 1055.  
 — Nachweis 1056.  
 Mikrobinsäure s. Chlorbenzoesäure.  
 Mikrophotographie 493.  
 Mikroskop, Anschaffung 479.  
 — Anwendung 463.  
 — Behandlung 480.  
 — Beleuchtungsapparate 475, 481.  
 — binokulares 477.  
 Mikroskop, Blenden 474.  
 — Dunkelfeldbeleuchtung 489.  
 — Einrichtung, mechanische 471.  
 — — optische 463.  
 — Lumineszenzmikroskop 493.  
 — Meßapparate 486.  
 — Nebenapparate 482.  
 — Objektische 473.  
 — Objektive 467.  
 — — Achromate 467.  
 — — Apochromate 468.  
 — — Fluoritsysteme 468.  
 — — Immersionssysteme 469.  
 — Okulare 470.  
 — Polarisationsapparate 488.  
 — Prüfung 479.  
 — Strahlengang 477.  
 — Tubus 471.  
 — Zählapparate 486.  
 — Zeichenapparate 483.  
 Mikroskopie 463.  
 — Ultramikroskopie 489.  
 Mikroskopische Dauerpräparate 533.  
 — Präparate 501.  
 — — Färbung 514.  
 — — Herstellung 501.  
 — Reagenzien 511.  
 Mikrospektroskop 488.  
 Mikrosublimation 1323.  
 Mikrotomtechnik 504.  
 Milch, serologische Untersuchung 692.  
 Milchfettrefraktometer 274.  
 Milchsäure, Bestimmung 801, 1100.  
 — Eigenschaften 1097.  
 — Nachweis 1097.  
 — — neben anderen organischen Säuren 1102.  
 Milchsäurebakterien 1624.  
 Mineralstoffe, Aufschließung mit Säuren 1221.  
 — Basenbestimmung, Analysengang 1223.  
 — Bestimmung 1208.  
 — Säurenbestimmung 1239.  
 Mirbanöl 1319.  
 Möhrenfarbstoff 1186.  
 Mohnblütenfarbstoff 1183, 1184.  
 MOHRsche Waage 10.  
 Monilia-Arten 1658.  
 Monoamino-dicarbon-säuren, Nachweis und Bestimmung 629.  
 Monoamino-monocarbon-säuren, Nachweis und Bestimmung 626.  
 Morphin 1349, 1352, 1365.  
 Morphosan 1349, 1356, 1365.  
 Mucor-Arten 1633, 1636.  
 Muscarin 1380.  
 Mutase, Bestimmung 813.  
 Mutterkorn, Nachweis 1337.  
 Mycoderma 1642.  
 Mycomyceten 1625.  
 Mycosphaerella 1651.  
 Mydalein 1379.  
 Mykologische Untersuchungen 1555.  
 — — Abimpfgeräte 1560.  
 — — Arbeitsraum 1556.  
 — — steriler Kasten 1557.  
 Nähragarplatten 1578.  
 Nährböden 1565.  
 — Abfüllen und Aufbewahren 1573.  
 — mit organischen Stoffen 1567.  
 — ohne organische Stoffe 1571.  
 Nährmittel, serologische Prüfung 697.  
 Naphthalin 1321.  
 Naphthole 1316.  
 Naphtholgelb, Nachweis 1191, 1198.  
 Narcein 1351, 1355, 1365.  
 Narkotin 1350, 1354, 1365.  
 Natrium, Bestimmung 1225, 1238.  
 Nephelometer 416.  
 Nephelometrie 403.  
 Nerin 1336.  
 Neuridin 1380.  
 Neurin 1379.  
 Nicotin 1342.  
 Nipacombin, Nipagin, Nipasol 1130.  
 Nitrate bei Vergiftungen 1428.  
 Nitrite, Bestimmung neben Sulfiten 668.  
 — bei Vergiftungen 1428.  
 Nitrobenzol 1319.  
 Nitrotoluole 1319.  
 Noctal 1368.  
 Novocain 1373.  
 Nucleasen, Gewinnung 778.  
 Nucleosidase, Gewinnung 780.  
 Nucleotidasen, Gewinnung 779.  
 Oberflächenspannung 57.  
 — Messung, Anwendung 65.  
 Oidium 1631.  
 Oidium 1651, 1662.  
 Oomyceten 1632.  
 Oospora 1662.  
 Opiumalkaloide 1346, 1351.  
 Optisches Drehungsvermögen 360.  
 Organische Säuren, Bestimmung 1072.  
 — — — acidimetrische 1072.  
 — — — jodometrische 1073.

- Organische Säuren, Bestimmung, oxydimetrische 1073.  
 — — flüchtige, Bestimmung durch Destillation 1156.  
 — — — — durch Verteilung 1158.  
 — — Nachweis, Analysengang 1146.  
 — — — durch ihre Ester 1074.  
 — — — mikrochemischer verschiedener Säuren 1146, 1148, 1150.
- Organische Stoffe, Bestimmung durch Oxydation 843.  
 — — Zerstörung 1381.
- Orleanfarbstoff 1185, 1204.  
 Ornithin, Nachweis 632.  
 Orthoform 1373.  
 Oxalsäure 1367.  
 — Bestimmung 1093, 1165.  
 — Eigenschaften 1091.  
 — Nachweis 1091.
- Oxybenzoesäure (p-), Bestimmung 1131.  
 — Nachweis 1130, 1153.
- Oxybenzoesäureester, Bestimmung 1132.  
 — Eigenschaften 1131.  
 — Nachweis 1131, 1153.
- Oxycymol 1316.  
 Oxydimorphin 1365.  
 Oxymethylfurfurol, Bestimmung 1057.  
 — Eigenschaften 1055.  
 — Nachweis 1056.
- Oxyprolin, Nachweis 633.
- Papain, Bestimmung 756.  
 — Gewinnung 776.
- Papaverin 1350, 1355, 1365.  
 Paraphenyldiamin 1372.  
 Paraphysen 1628.
- Pektin, Galakturonsäurebestimmungen darin: 950.  
 — Methoxylbestimmung 592.  
 — Methylalkoholbestimmung 953.  
 — Nachweis 950.
- Pektinspaltende Enzyme, Gewinnung und Reinigung 745.
- Pektinstoffe, Begriff 947.  
 — Gelierkraftbestimmung 957.
- Penicillium 1647.
- Pentosane, Bestimmung 928.  
 — — mit Barbitursäure 930.  
 — — mit Phloroglucin 928.  
 — — nach KULLGREN und TYDÉN 932.  
 — — nach TOLLENS 928.
- Pentosane, Bestimmung nach UNGER 930.  
 — Einteilung und Bestimmung 936.  
 — Hemipentosane 936.  
 — Methylpentosane, Bestimmung 934.  
 — Protopentosane 936.
- Pentosen, Bestimmung durch Reduktion 863.  
 — Nachweis 855.
- Pepsin, Bestimmung 758.  
 — Gewinnung und Reinigung 766.
- Peptone, Bestimmung 611.  
 Percain 1374.  
 Perithezien 1628.  
 Peronin 1350, 1357, 1365.
- Peroxydase, Bestimmung und Darstellung 820.
- PETRI-Schalen 1578.  
 Petroleum 1320.  
 Pferdefleisch, Nachweis, serologischer 688.
- Phanodorm 1368.  
 Phenacitin 1370.  
 Phenol, Bestimmung 1313.  
 — Nachweis 1312.
- Phenole, Reaktionen 1311.
- Phenylalanin, Bestimmung 627.  
 — Nachweis 627.
- pH-Messung s. Stufenmessung.  
 Phoma 1658.
- Phosphatasen, Bestimmung 723.
- Phosphine, Nachweis 1286.
- Phosphor, Bestimmung 587.  
 — — Mikrobestimmung 599.  
 — elementarer, Bestimmung 1286.  
 — — Nachweis 1279.  
 — — Vorproben 1279.  
 — — Nachweis 568.
- Phosphorhalogene, Nachweis 1287.
- Phosphorsäure, Bestimmung 1257.  
 — — colorimetrisch 1262.  
 — — als Magnesiumpyrophosphat 1261.  
 — — maßanalytische 1262.  
 — — mikrochemische 1263.  
 — — Molybdänverfahren 1258.
- Phosphorwasserstoff, Nachweis 1286.
- Photometer, Stufenphotometer 433.
- Phykomyces nitens 1639.
- Phykomyeten 1625, 1632, 1635.
- Physostigmin 1358, 1365.
- Phytin, Nachweis und Bestimmung 974.
- Pikrinsäure, Nachweis 1197, 1367.  
 Pikrotoxin, Nachweis 1331.  
 Pilocarpin 1358.
- Pilze, Charakterisierung 1599.  
 — — morphologische 1599.  
 — — physiologische 1607.  
 — — — Enzymerzeugung 1608.  
 — — — Nährstoffbedürfnis und Assimilation 1607.  
 — — — Stoffwechselprodukte 1612.  
 — Systematik 1618.
- Piperonal, Bestimmung 1054.  
 — Eigenschaften 1050.  
 — Nachweis 1053.
- Plektenchym 1625.
- Polarimetrie 356.  
 Polarisationsapparate 368.  
 — Kreispolarisimeter 369.  
 — Saccharimeter 382.  
 — Zubehörteile 389.
- Polarisator und Analysator 360.
- Polarisatoren 358.
- Polarisiertes Licht, Eigenschaften und Herstellung 356.
- Polyasen, Gewinnung und Reinigung 741.
- Potentiometer 142, 145.
- Präcipitine 670, 672, 675, 677.
- Präcipitinogene 675.
- Prolin, Nachweis 633.
- Propionsäure, 1141.
- Propylalkohol s. auch Isopropylalkohol.
- Propylalkohole, Bestimmung 1014.  
 — Eigenschaften 1014.
- Proteasen des Blutes 770.  
 — Bestimmung, allgemeine Methodik 746.  
 — der Hefe, Gewinnung 773.  
 — des Pankreas, Gewinnung 764.  
 — pflanzliche, Gewinnung 773.  
 — der Samen, Gewinnung 777.  
 — der tierischen Organe und Gewebe, Gewinnung 768.  
 — des Verdauungstraktes, Gewinnung 760.
- Proteine, Artspesifität 678.  
 — Bestimmung 602.  
 — — Proteosen 611.  
 — — Peptone 611.  
 — — Reinproteine 607.  
 — — Rohprotein 606.  
 — — verdauliches Protein 610.  
 — biologische Reaktion 685.

- Proteine, hetero- und homologe Fällungen 678.  
 — Hydrolyse 613.  
 — Nachweis 602.  
 — — durch Aussalzung 603.  
 — — Fällungsreaktionen 603.  
 — — Farbenreaktionen 604.  
 — — Gerinnungsreaktionen 603.  
 — pflanzliche, serologische Unterscheidung 698.  
 — Präcipitinreaktion 685.  
 — serologischer Nachweis 670.  
 — spezifische tierische und pflanzliche, Nachweis 680.  
 Proteolytische Enzyme siehe Proteasen.  
 Proteosen, Bestimmung 611.  
 Protohexosane 936.  
 Protopentosane 936.  
 Pseudoaconitin 1344.  
 Ptomaine 1375.  
 Puffermischungen nach MICHAELIS 707.  
 Purinabkömmlinge 1339.  
 Purinamidasen, Bestimmung 787.  
 Putrescin 1378.  
 Pyknometer 5, 7, 8.  
 Pyramidon 1371.  
 Pyrenomyceten 1650.  
 Pyridin 1372.  
  
 Quecksilber, Nachweis und Bestimmung 1408.  
 Quecksilberdampflampen 319.  
  
 Rachitis, Nachweis, Aschengehalt der Knochen 1508.  
 — — Blut und Faeces 1509.  
 — — Röntgendiagnose 1507.  
 Raffinose, Nachweis 858.  
 Ratten, Zucht für Vitaminversuche 1470.  
 — — — Fütterung 1477.  
 — — — Käfige 1473.  
 Reagenzien, Reinigung und Prüfung 1433.  
 Reduktions-Oxydations-Potentiale 216.  
 Refraktometer, ABBEESches 278.  
 — Butterrefraktometer 271.  
 — Eintauchrefraktometer 274.  
 — Justierung 287.  
 — Messungen, Grundlagen 287.  
 — Milchfettrefraktometer 274.  
 Refraktometrie 261.  
 — Apparate 262.  
 Reibung, innere s. Viscosität.
- Reibungskoeffizient 17.  
 Reinkulturen, Aufbewahrung 1591.  
 Reinzucht anaerober Arten 1584.  
 Reinzüchtung von Bakterien und Emmyceten 1574.  
 — Anreicherungsverfahren 1583.  
 — Verdünnungsverfahren 1575.  
 — — nach BURRI 1576.  
 — — nach HANSEN 1575.  
 — — nach LINDNER 1575.  
 — — Plattenkultur 1577.  
 — — — Einzellverfahren 1581.  
 — — — nach KOCH 1577.  
 — — — Oberflächenkultur 1580.  
 — — — Rollkultur 1581.  
 Resorcin 1366.  
 Respirationsapparat 1466.  
 Rhamnose, Bestimmung 935.  
 Rhizopus 1634.  
 Rohfaser, Bestimmung 936.  
 — — von Cellulose, Lignin und Cutin darin 945.  
 — — nach HENNEBERG-STOHMANN 940.  
 — — nach KÖNIG 941.  
 — — nach KÜRSCNER-HANAK 943.  
 — — Weender Verfahren 940.  
 Rostpilze 1658.  
 Rotationsdispersion 366.  
 — Bestimmung 381.  
 Rote Rüben, Farbstoff 1183, 1204.  
 Rotweinfarbstoff 1204.  
  
 Saccharase, Bestimmung 727.  
 — Reinigung 737.  
 Saccharimeter 382.  
 Saccharomyceten 1640.  
 Saccharose, Bestimmung 883.  
 — — neben anderen Zuckern 884.  
 — — neben Fructosanen 898.  
 — — Nachweis 858.  
 Sadebaumöl 1320.  
 Säuren, organische Säuren s. Organische Säuren.  
 Saflorfarbstoff 1185, 1204.  
 Safranfarbstoff 1185, 1204.  
 Salicylaldehyd 1054.  
 Salicylsäure 1135, 1318.  
 — Bestimmung 1137, 1318.  
 — Eigenschaften 1135.  
 — Nachweis 1135, 1152, 1318.  
 Salol 1137.  
 Salophen 1371.  
 Salpetersäure, Bestimmung 652.
- Salpetersäure, Bestimmung, Ammoniakverfahren 655.  
 — — colorimetrisches Verfahren 659.  
 — — Nitronverfahren 658.  
 — — Stickoxydverfahren 652.  
 — — sonstige Verfahren 660.  
 — — Nachweis 650.  
 Salpetrige Säure, Bestimmung 663.  
 — — Aminosulfonsäure-Verfahren 665.  
 — — bromometrische 665.  
 — — colorimetrische 668.  
 — — gasometrische 666.  
 — — jodometrische 664.  
 — — Methylesterverfahren 667.  
 — — Permanganatverfahren 663.  
 — — Nachweis 660.  
 Sandelholzfarbstoff 1183.  
 Santonin, Nachweis und Bestimmung 1330.  
 Santoptal 1368.  
 Saponine 1336.  
 Saponine, Nachweis 1336.  
 Sapotoxin 1336.  
 Saprin 1379.  
 Sauerstoff, Bestimmung durch Hydrierung 593.  
 — Nachweis 566.  
 Schierling, Wasserschierling 1332.  
 Schizosaccharomyceten 1641.  
 Schleimstoffe, Untersuchung 959.  
 Schmelzpunkt, Bestimmung, allgemeines 89.  
 — — Apparate 93.  
 — — Heizvorrichtungen 92.  
 — — Mikroapparate 489.  
 Schokolade, serologische Prüfung 698.  
 Schwefel, Bestimmung 585.  
 — — nach DENNSTEDT 591.  
 — — Mikrobestimmung 599.  
 — — Gesamt-Schwefel, Bestimmung 1251.  
 — — Nachweis 567.  
 Schwefelbakterien 1625.  
 Schwefelkohlenstoff 1292.  
 — Bestimmung 1295.  
 — Nachweis 1294.  
 Schwefelsäure, Bestimmung 1251.  
 — freie, Nachweis 1424.  
 Schwefelwasserstoff, Nachweis und Bestimmung 1423.  
 Schweflige Säure:  
 — Bestimmung 1255, 1424.  
 — Nachweis 1253, 1424.  
 Scilla-Glucoside 1336.

- Scopolamin 1360.  
 Selen, Nachweis und Bestimmung 1408.  
 Senegin 1336.  
 Senföl 1320.  
 Senkwaage s. Aräometer.  
 Serin 628.  
 Serologische Proteinunterscheidung 670.  
 — Untersuchung 689.  
 — — Casein 692.  
 — — Cerealien 699.  
 — — Eigelb 695.  
 — — Eiweiß 695.  
 — — Fett 692.  
 — — Fleisch 688, 691.  
 — — Honig 696.  
 — — Kaviar 696.  
 — — Leguminosen 699.  
 — — Marzipan 698.  
 — — Milch 692.  
 — — Nährmittel 697.  
 — — Schokolade 698.  
 — — Wurst 688, 691.  
 — — Wurtsbindemittel 694.  
 Siedepunkt, Abhängigkeit 103.  
 — Bestimmung, Allgemeines 103, 105.  
 — — Apparate 107.  
 Silber, Nachweis und Bestimmung 1416.  
 Silicofluorwasserstoffsäure, Nachweis und Bestimmung 1250.  
 Sklerotien 1625.  
 Skorbut, Diagnose 1533.  
 Solanin, Nachweis 1338, 1365.  
 Solbrol 1130.  
 Sorbit, Nachweis und Bestimmung 965.  
 Spektralapparate 301.  
 — Eichung 311.  
 Spektralphotometer 344.  
 Spektralphotometrie, photographische 347.  
 Spektren, Absorptionsspektren s. Absorptionsspektren.  
 — Bandenspektren 298.  
 — Emissionsspektren 298, 314.  
 — kontinuierliche 298.  
 — Linienspektren 298.  
 Spektrographen 307.  
 — Allgemeines 310.  
 Spektrophotometrie, Extinktionskoeffizienten 344.  
 Spektroskope, Gitterspektroskope 306.  
 — Taschenspektroskope 306.  
 Spektroskopie 298.  
 — Absorptionsspektroskopie s. Absorptionsspektroskopie.  
 — Beugungsgitter 303.  
 — Einheiten 300.  
 Spektroskopie, Emissionsspektroskopie s. Emissionsspektroskopie.  
 — Lichtquellen 316.  
 — photographische Praxis 315.  
 — Wellenlängenmessung 314.  
 Spezifische Masse 1.  
 Spezifisches Gewicht 1.  
 Spezifisches Gewicht fester Stoffe:  
 — Bestimmung, Auftriebsmethode 6.  
 — — direkte 4.  
 — — indirekte 5.  
 — — Pyknometermethode 5.  
 — — Schwebemethode 6.  
 Spezifisches Gewicht von Flüssigkeiten:  
 — Bestimmung, Hydrometermethode 7.  
 — — mittels hydrostatischer Waage 10.  
 — — Pyknometermethode 7.  
 — — mittels Senkwaage 13.  
 — — mittels Skalenaeräometers 13.  
 — — mittels versenkter Schwimmer 15.  
 Spezifisches Gewicht von Gasen, Bestimmung 15.  
 — — scheinbares 2.  
 Spezifisches Volumen 1.  
 Sporangium 1629.  
 Sporodesmium 1658.  
 Sproßpilze, Untersuchung 1601.  
 Stärke, Bestimmung 913, 927.  
 — — direkte 913.  
 — — polarimetrische 919.  
 — — nach EWERS 920.  
 — — nach v. FELLEBERG 917.  
 — — nach GROSSFELD 921.  
 — — nach LINTNER 919.  
 — — nach MANNICH 922.  
 — — nach MAYRHOFER 913.  
 — — nach RASK 915.  
 — — durch Verzuckerung 923.  
 — Nachweis 912.  
 Stalagmetrie 63.  
 Sterigmen 1628.  
 Sterilisierung 1561.  
 — fraktionierte 1563.  
 Stickstoff, Bestimmung 575.  
 — — nach DENNSTEDT 591.  
 — — nach DUMAS 580.  
 — — nach KJELDAHL 575.  
 — — nach TER MEULEN-HESLINGA 581.  
 — — nach WILL-VARRENTRAPP 581.  
 — — Mikrobestimmung nach DUMAS 598.  
 — — nach KJELDAHL 599.  
 Stickstoff, Nachweis 566.  
 Stickstofffreie Extraktstoffe 835.  
 Stickstoffsäuren, Nachweis 1424.  
 Stickstoffsubstanzen, bakterielle Zersetzung 1615.  
 Stickstoffverbindungen, Bestimmung 602.  
 Stoffumsatz, Bestimmung 1466.  
 Stovain 1374.  
 Streuung, biologische, Auswertung 1441.  
 Stroma 1625.  
 Strontium, Nachweis 1421.  
 Strophanthin 1335.  
 Strychnin 1361.  
 Stufenmessung, Colorimetermethode 166.  
 — Definitionen 136.  
 — Doppelkeilmethode 167.  
 — elektrische, Ausschlagsmethode 139.  
 — — Auswertung der Messungen 154.  
 — — Kompensationsmethode 140.  
 — — Meßanordnung 139.  
 — — Meßelektroden 149.  
 — — Methoden 138.  
 — — Röhrenvoltmetermethode 146.  
 — — Titrationsmethode 148.  
 — elektrostatische 139.  
 — Indicatorenmethoden, absolute Meßverfahren 171.  
 — — Allgemeines 159.  
 — — Komparatormethode 165.  
 — — relative Meßverfahren 165.  
 — Meßverfahren 138.  
 — Mischfarbencolorimeter 168.  
 — potentiometrische 138.  
 Stufentitration, acidimetrische, Ausführung 204.  
 — — Grundlagen 196.  
 Styanus 1658.  
 Sulfatase, Bestimmung 724.  
 Sulfide, Nachweis 1422.  
 Sulfite, Bestimmung neben Nitriten 668.  
 Sulfonal 1368.  
 Suprarenin 1374.  
 Tannase, Bestimmung 724.  
 Tannin, Eigenschaften 1169.  
 Tartrazin, Nachweis 1191.  
 Tauben, Zucht für Vitaminversuche 1483.  
 Taxin 1342.

- Tellur 1408.  
 Tetrachlorkohlenstoff 1299.  
 Tetranol 1368.  
 Thallium, Nachweis 1415.  
 Thamnidium elegans 1639.  
 Thebain 1351, 1355, 1365.  
 Thermische Energie, Bestimmung 1467.  
 Thermometer, BECKMANN-  
 sches 115.  
 Thermoregulatoren 545, 1558.  
 Thermostate 1557.  
 Thiosulfat, Unterscheidung  
 von Sulfid 1255.  
 Thrombin und Thrombo-  
 kinase, Gewinnung 771.  
 Thymol 1316.  
 Tiercalorimeter 1466.  
 Tintometer 438.  
 Titration, elektrometrische  
 208.  
 Titrationskurven 198.  
 — korrigierte 200.  
 Torulahefen 1642.  
 Tran, Vitamin-A-Nachweis  
 1502.  
 — — — Antimontrichlorid-  
 reaktion 1502.  
 — — — spektroskopische  
 1504, 1546.  
 Traubensäure, Nachweis und  
 Bestimmung 1115.  
 Trichloräthylen 1299.  
 Trichothecium 1658.  
 Trifuctosan, Nachweis 860.  
 Trimethylamin, Bestimmung  
 640.  
 Triodometer 146.  
 Trional 1368.  
 Trockenapparate 540.  
 Trockenröhren 549.  
 Trockenschränke 540.  
 Tropacocain 1359.  
 Tropfenkultur 1598.  
 Tyrosinase, Bestimmung 815.  
 Tryptophan, Bestimmung 634.  
 — Nachweis 634.  
 Ultrafilter, Herstellung und  
 Behandlung 31.  
 Ultrafiltration 29.  
 — Apparate 35.  
 — Elektro-Ultrafiltration 40,  
 55.  
 Ultramikroskop 489.  
 Unterschweflige Säure, Be-  
 stimmung 1257.  
 Untersuchungsergebnisse, Ab-  
 leitung von Gesetzmäßig-  
 keiten 1443.  
 — Auswertung 1438.  
 — Glätten von Kurven 1448.  
 Uran, Nachweis 1419.  
 Urease, Bestimmung 782.  
 Uredineen 1653.  
 Urikase, Bestimmung 815.  
 Ustilagineen 1653.  
 Valeriansäure 1142.  
 Valin, Nachweis 626.  
 Vanillin, Bestimmung 1051.  
 — Eigenschaften 1050.  
 — Nachweis 1050.  
 Veramon 1368.  
 Veratrin 1343, 1365.  
 Verbrennungsbombe 123.  
 Verbrennungswärme 122.  
 Verbrennungswärmebestim-  
 mung, Apparate 123.  
 — Ausführung 127.  
 — Berechnung der Ergeb-  
 nisse 131.  
 — Mikroapparate 135.  
 Verdaulichkeit, Bestimmung  
 1457.  
 Verdauung, künstliche 1465.  
 Verdauungsversuche am Men-  
 schen 1457.  
 Veronal 1368.  
 Verticillium 1658.  
 Victoriagelb, Nachweis 1197.  
 Viscosimeter 18.  
 — Capillarviscosimeter 22.  
 — nach ENGLER-HOLDE 25.  
 — Kugelfallapparate 21.  
 — Metallviscosimeter nach  
 HOLDE 27.  
 — technische 25.  
 — Torsions-Viscosimeter 21.  
 Viskosität, Bestimmung, Aus-  
 strömungsmethode 22.  
 — Messung 17.  
 Vitamine, Nachweis und Be-  
 stimmung 1469.  
 Vitamin A 1484, 1543.  
 — Antimontrichloridreaktion  
 1502, 1545.  
 — Bestimmung 1485, 1544.  
 — Einheiten 1500, 1543.  
 — Farbenreaktionen 1505.  
 — Mangelerscheinungen 1494.  
 — Nachweis 1494.  
 — — Antimontrichlorid-  
 reaktion 1502, 1545.  
 — — Farbenreaktionen 1505.  
 — — Tierversuch 1494, 1543.  
 — — Toxizität 1502.  
 — Versuche, Käfige 1485.  
 — — Nahrung 1489.  
 — — Raum 1488.  
 — — Tiere 1484.  
 — vitaminfreie Nahrung 1489,  
 1492.  
 — Wirkung 1501.  
 Vitamin B 1516.  
 Vitamin B<sub>1</sub> 1517.  
 — Einheiten 1521.  
 — Farbenreaktionen 1550.  
 — Heilversuch 1525.  
 — Rattenversuch 1517, 1548.  
 Vitamin B<sub>1</sub>, Schutzversuch  
 1522.  
 — Taubenversuch 1522, 1549.  
 — Versuchsfutter 1517.  
 Vitamin B<sub>2</sub> 1526, 1550.  
 — Einheiten 1527.  
 — Messung 1527.  
 — Versuchsfutter 1526.  
 — B, andere 1527.  
 Vitamin C 1528, 1551.  
 — Bestand im Menschen 1542.  
 — Bestimmung, Mikrobestim-  
 mung 1553.  
 — — titrimetrische nach  
 TILLMANS 1538, 1552.  
 — — sonstige 1554.  
 — Einheiten 1538, 1554.  
 — Gehalt 1535, 1552.  
 — Heilversuch 1538.  
 — Nachweis 1542.  
 — — BEZSSONOFFSche Reak-  
 tion 1543.  
 — Versuche, Auswertung  
 1533, 1535.  
 — — Fütterung 1528, 1531,  
 1551.  
 — — Käfige 1528.  
 — — Tiere 1530.  
 Vitamin D 1505, 1547.  
 — Bestimmung durch Schutz-  
 versuch 1507.  
 — Einheiten 1513, 1547.  
 — Nachweis 1507.  
 — — Farbenreaktionen 1513.  
 — — Heilversuch 1509, 1511.  
 — — Line-test 1510.  
 — — Schutzversuch 1507.  
 — — spektroskopischer 1513.  
 — Toxizität 1514.  
 — Versuche 1505.  
 — — Fütterung 1505.  
 — — Käfige 1505.  
 Vitamin E 1515, 1548.  
 Vitaminversuche, Mäusezucht  
 1480.  
 — Meerschweinchenzucht  
 1481.  
 — Versuchstiere 1469.  
 Volumenometer 4.  
 — s. auch Aräometer.  
 Wasser, Bestimmung s. Was-  
 serbestimmung.  
 — Dichte 2, 837.  
 — Nachweis s. Wassernach-  
 weis.  
 Wasserbestimmung 537.  
 — durch Absorption 553.  
 — Calciumcarbidmethode 557.  
 — Calciumhydridmethode  
 560.  
 — durch chemische Um-  
 setzungen 557.  
 — durch Destillation 553.  
 — mittels Dielektrizitätskon-  
 stanten 562.

- Wasserbestimmung durch elektrischen Widerstand 564.  
 — Exsiccatoren 546.  
 — mittels Leitfähigkeitsmessung 564.  
 — Siedeflüssigkeiten 553.  
 — Thermoregulatoren 544.  
 — Trockenapparate 540.  
 — Trockenmittel 546.  
 — Trockenröhren 549.  
 — Trockenschränke 540.  
 — Trocknungsverfahren 549.  
 — aus dem Trockenverlust 539.  
 — weitere Methoden 561, 564.  
 Wasserglas 1422.  
 Wasserlösliche Stoffe, Bestimmung 836.  
 Wassernachweis 538.  
 Wasserschieferling 1332.  
 Wasserstoff, Bestimmung 568.  
 — — Mikrobestimmung 596.  
 — Nachweis 566.  
 Wasserstoffionenaktivität, Bedeutung 137.  
 — Bestimmung s. Stufenmessung.  
 Wasserstoffsuperoxyd, Bestimmung 1270.  
 — Eigenschaften 1268.  
 — Nachweis 1269.
- Weinsäure, Bestimmung 1111, 1161, 1164.  
 — Eigenschaften 1109.  
 — Nachweis 1109, 1151, 1152.  
 WESTPHALSche Waage 10.  
 Wismut, Nachweis und Bestimmung 1416.  
 Wurst, serologische Prüfung 688, 691.  
 Wurstbindemittel, serologische Prüfung 694.
- Xerophthalmie 1494.  
 Xylosan, Bestimmung s. Pentosane, Bestimmung.  
 Xylose, Nachweis 858.
- Yohimbin 1364, 1365.
- Zähigkeit s. Viscosität.  
 Zählkammer 1596.  
 Zimtaldehyd 1054.  
 Zimtsäure, Bestimmung 1141, 1168.  
 — Eigenschaften 1139.  
 — Nachweis 1139, 1153.
- Zink, Nachweis und Bestimmung 1418.  
 Zinn, Nachweis und Bestimmung 1407.
- Zookinase, Darstellung 769.  
 Zucker, Bestimmung s. Zuckerbestimmung.  
 — Reaktionen 845.  
 Zuckerarten, Bestimmung durch Vergärung 904.  
 Zuckerbestimmung durch Polarisation 875.  
 — — Klärung und Entfärbung von Lösungen 879.  
 — — spezifische Drehung 877.  
 — durch Reduktion 861.  
 — — nach BRUHNS 869.  
 — — nach FEHLING 861.  
 — — nach HAGEDORN und JENSEN 873.  
 — — LUFF 871.  
 — — nach SCHOORL 866.  
 — — von FEHLINGScher Lösung 860.  
 — — gewichtsanalytische 861.  
 — — jodometrische 865, 866.  
 — — maßanalytische 863, 871.  
 — — rhodanometrische 869.  
 — durch Vergärung 904.  
 Zuckerlösungen, Dichte 838.  
 Zygomyceten 1632.  
 Zygosporien 1627.