Zeitschrift

für

Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 11.

15. Dezember 1920.

Band 40.

Untersuchungen über Fleischbrühe.

Von

Privatdozent Dr. Ernst Waser in Zürich.

[Eingegangen am 6. August 1920.]

1. Allgemeines.

A. Brillat-Savarin definierte vor rund 100 Jahren als „Kochfleisch ein Stück Fleisch, aus welchem die löslichen Teile mittels leicht gesalzenen, siedenden Wassers ausgezogen werden. Fleischbrühe nennt man die Flüssigkeit, die nach Abschluß des Verfahrens übrig bleibt und Suppenfleisch endlich nennt man das durch diese Prozedur seiner löslichen Bestandteile beraubte Fleisch“.

Diese Definition besteht auch heute noch zu Recht; sie sagt das wesentliche über den landläufigen Begriff Fleischbrühe und läßt nur die Frage offen, ob das Kochfleisch in siedendes Wasser eingelegt, oder zusammen mit dem Wasser erhitzt werden soll. Bei chemischen Untersuchungen wird man sich hüten, der ohnehin schon kompliziert zusammengesetzten Brühe durch irgendwelche Prozesse noch weitere Substanzen zuzusetzen. Man wird auf das Auslaugen des Fleisches mit kochsalzhaltigem Wasser verzichten und an dessen Stelle reines, destilliertes Wasser verwenden. Ferner wird man sehr auf die Beschaffenheit des als Ausgangsmaterial gewählten Fleisches achten. Die Fleischbrühe, wie sie in der Küche hergestellt wird, enthält meist größere Mengen von Fett, Leim und ähnlichen Substanzen, die im täglichen Leben als erwünschte Begleitstoffe gelten und ganz gewiß auch den eigentlichen Fleischbrühe-Geschmack mehr hervortreten lassen. Wo es sich aber um die Untersuchung oder Isolierung der Geschmacksträger der reinen Fleischbrühe handelt, wird man die Anwesenheit solcher Körper als lästig empfinden und nach Möglichkeit vermeiden. Demgemäß wurde die für die vorliegende Untersuchung benötigte Fleischbrühe durch Auslaugen von sorgfältig ausgewähltem, von Fett, Knochen und Bindegewebe nach Möglichkeit befreitem Rindfleisch mit siedendem, destilliertem Wasser hergestellt.

2. Vorgänge bei der Herstellung der Fleischbrühe.

Legt man ein Stück Muskelfleisch vom Rinde in Wasser und erhitzt langsam, so beginnt etwas über 45° das Eiweiß des Muskels zu gerinnen, indem es sich gleichzeitig zusammenzieht und dabei selbsttätig eine wässrige Flüssigkeit auspreßt. Das Maß des Zusammenschrumpfens und des Auspressens von Flüssigkeit aus dem Fleisch richtet sich nach der Höhe des Erhitzens bzw. nach der Menge der in das Fleisch eindringenden Wärme. J. Roland¹⁾ macht darüber die folgenden Angaben:

¹⁾ J. Roland, Unsere Lebensmittel. 1917, S. 99.

Temperatur:	40—45°	45—56°	56—66°	66—75°	75—86°	86—95°
Gewichtsverlust in % des Fleisches:	3,57	7,21	15,83	10,65	8,30	1,73%

Der Gesamt-Gewichtsverlust, den mageres Rindfleisch beim Garkochen erleidet, stellt sich also auf etwa 40%. Selbstverständlich betrifft dieser Verlust wesentlich das im Fleisch bis zu Mengen von 75—76% enthaltene Wasser. Die Fleischbrühe selbst enthält durchschnittlich 3—5% feste Stoffe.

Extrahiert man rohes Fleisch mit kaltem Wasser, so enthält nach den Untersuchungen von H. S. Grindley¹⁾ der Auszug bis zu 7,4% feste Stoffe.

Legt man das Fleisch direkt in siedendes Wasser, so wird naturgemäß der Gehalt der Fleischbrühe an festen Stoffen kleiner sein als bei dem soeben beschriebenen Verfahren, da sich durch die Gerinnung der oberflächlichen Eiweißschichten beim Einlegen in heißes Wasser bekanntlich eine Schutzhülle bildet, die das weitere Auslaugen der sogenannten Extraktivstoffe des Fleisches sehr erschwert.

Wo es also darauf ankommt, eine extraktreiche Brühe zu bekommen, wird man das Fleisch in kaltes Wasser einlegen, langsam bis in die Nähe der Siedetemperatur erhitzen und sehr gelinde weiter sieden oder noch besser durch Einstellen ins Wasserbad, in eine Kochkiste oder dergl. das Fleisch bis zum Garwerden auf einer Temperatur etwas unter dem Siedepunkt erhalten. Eine weitere Erhöhung der Extraktausbeute kann natürlich durch Verwendung von möglichst stark zerkleinertem Fleisch erzielt werden.

Da es sich bei dieser Untersuchung nicht so sehr darum handelte, die durch siedendes Wasser dem Fleisch entzogenen Stoffe überhaupt kennen zu lernen, sondern in erster Linie darum, die spezifischen Geschmacksträger kennen zu lernen, so war es vor allem nötig, sich zu vergewissern, nach welchem der geschilderten Herstellungsverfahren man die am besten schmeckende Brühe erhält, ohne Rücksicht auf die dabei erzielten Extraktausbeuten.

Es wurden also eine Reihe von auf verschiedenen Wegen erhaltenen Fleischbrühen auf ihren Geschmack untersucht.

Bei diesen und den folgenden Geschmacksproben beteiligten sich stets einige Fachleute, die in derartigen Geschmacksprüfungen große Erfahrungen besaßen.

a) Kaltwasserauszug.

1 kg fett- und sehnenfreies, durch den Fleischwolf getriebenes Rindfleisch wurde mit je 2 l Brunnenwasser bei einer Temperatur unter 10° viermal je 1/2 Stunde gut verrührt und durch Kolieren vom Extrakt abgetrennt. Im letzten Extrakt waren nur noch Spuren von Eiweiß enthalten. Die beiden ersten Extrakte wurden vereinigt (die beiden letzten verworfen), 3/4 Stunden im Wasserbad auf 90° erhitzt, vom Coagulum abgesaugt und mit wenig heißem Wasser nachgewaschen. Das klare Filtrat wurde in 2 Teile geteilt, der eine nur kurz aufgekocht, der andere 1 1/2 Stunden lang im Sieden erhalten.

Das mit kaltem Wasser fast völlig ausgelaugte Fleisch wurde in die doppelte Gewichtsmenge siedendes Wasser (etwa 1 1/2 l) eingelegt, 1 3/4 Stunden gelinde gekocht und die Brühe durch Kolieren abgetrennt.

Die Geschmacksprobe dieser 3 Brühen ergab: Völlige Geschmacklosigkeit des letzten, in der Hitze gewonnenen Extraktes; etwas besseren Geschmack bei dem nur kurze

¹⁾ Journ. Americ. Chem. Soc. 1904, 26, 1086.

Zeit erhitzten, und sehr deutlichen Fleischbrühageschmack bei dem nachträglich ($1\frac{1}{2}$ Stunden) erhitzten Kaltwasserextrakt. Der unveränderte, nicht erwärmte Kaltwasserextrakt besaß einen ganz faden, nichtssagenden Geschmack.

Daraus geht hervor, daß man mit kaltem Wasser dem Fleisch diejenigen Stoffe entziehen kann, die man als Muttersubstanzen der Geschmacksstoffe anzusehen hat, daß das eigentliche Fleischbrüharoma aber erst beim Erhitzen auf 100^0 und am besten bei längerem Verweilen auf dieser Temperatur entwickelt wird.

b) Eigentliche Fleischbrühen.

α) 1 kg fett- und sehnenfreies, fein gehacktes Rindfleisch wurde mit 3 l Wasser gut vermischt und nach halbstündigem Auslaugen auf schwaches Feuer gesetzt und so langsam wie möglich unter beständigem Umrühren zum Kochen gebracht. Das hierauf folgende zweistündige Auskochen geschah auf ganz kleiner Flamme.

β) 1 kg fett- und sehnenfreies, fein gehacktes Rindfleisch (vom nämlichen Stück wie das vorhergehende) wurde in 3 l siedendes Wasser gegeben, gut verrührt, um das Zusammenballen zu verhindern und wie das vorhergehende auf kleiner Flamme während 2 Stunden gelinde gekocht. Die durch Filtration gewonnenen klaren Lösungen wurden direkt zur Geschmacksprobe verwendet.

Beide Brühen schmeckten viel reiner und deutlicher als der beste Kaltwasser-auszug und übereinstimmend wurde festgestellt, daß die durch direktes Einbringen des Fleisches in heißes Wasser hergestellte Brühe den ausgeprägtesten und reinsten Fleischbrühageschmack besaß.

Alle im weiteren zur Untersuchung gelangenden Fleischbrühen wurden daher nach folgendem Rezept hergestellt:

3—4 Tage altes Rindfleisch (Schwanzstück, Keule, Huft, Stotzen) wird in dünne Streifen geschnitten und dabei sorgfältig von anhaftendem Fett, Sehnen, Haut und Bindegewebe befreit. Das Fleisch wird durch 1—2-maliges Passieren des Fleischwolves möglichst fein zerteilt, wobei man Sorge trägt, daß der hierbei austretende Fleischsaft nicht verloren geht (Porzellanunterlage). Das so vorbereitete Fleisch samt dem etwa ausgetretenen Saft wird entweder in einem Glaskolben oder in einem größeren aluminieren Kessel in die 2—3-fache Menge siedendes Wasser gegeben. Nachdem das anfängliche Aufschäumen vorüber ist, wird ein Rückflußkühler aufgesetzt und nun $1\frac{3}{4}$ —2 Stunden in gelindem Sieden erhalten. Hierauf wird noch heiß durch ein Nutschenfilter abgesaugt, mit kochendem Wasser nachgewaschen und erkalten gelassen. Etwa sich ausscheidendes Fett wird mechanisch oder durch nochmaliges Filtrieren in der Kälte beseitigt.

3. Frühere Arbeiten über Fleischbrühe.

Angefangen mit J. v. Liebig, Kemmerich, Bunge, Aubert und Dehn, führt die Reihe der Chemiker und Physiologen, die sich mit Untersuchungen über Fleisch, Fleischsaft, Fleischextrakt und Fleischbrühe beschäftigten, bis in die neueste Zeit und es besteht somit auch durchaus kein Mangel an Untersuchungsmethoden und -resultaten. Alle bisherigen Forscher gaben sich aber durchweg mit der Frage nach dem Nährstoffgehalt, dem Nährwert, nach der Verdaulichkeit, nach der physiologischen Wirkung dieser Produkte ab und es wäre eine lohnende Aufgabe, alle diese verschiedenen Arbeiten und Ansichten zu sammeln und kritisch zu besprechen. Eine flüchtige Durchsicht der Literatur ergibt, daß bis heute gegen 50 verschiedene organi-

sche Substanzen als Bestandteile des Muskelfleisches erkannt worden sind, von denen wohl der größere Teil bei der Extraktion auch in die Fleischbrühe übergeht. Die meisten dieser Körper sind wohl nur qualitativ nachgewiesen worden; über das Mengenverhältnis, in dem sie sich in der Fleischbrühe vorfinden, ist nur bei den wenigsten genaueres bekannt. Die folgende Übersicht, die auf Vollständigkeit keinen Anspruch erhebt, soll einen Begriff von dem Reichtum an Formen vermitteln. Dabei sind die anorganischen Bestandteile, die Peptone, Albumosen und Eiweißkörper noch gar nicht berücksichtigt.

Neutralkörper:	Saure Körper:		Basische Körper:
	stickstofffreie	stickstoffhaltige	
Äthylalkohol	Ameisensäure	α -Alanin	Kreatin
Glycerin	Essigsäure	β -Alanin	Kreatinin usw.
Fette	Buttersäure	Leucin	Methylhydantoin
Glykose	Oxalsäure	Isoleucin	Methylguanidin
Maltose	Bernsteinsäure	Asparaginsäure	Cholin
Glykogen	Glyoxylsäure	Glutaminsäure	Neurin
Inosit	Milchsäuren	Arginin	Neuridin
Harnstoff		Harnsäure	Carnosin
Taurin		Fleischsäuren	Carnitin usw.
Lecithin		Oxyfleischsäuren	Hypoxanthin
Inosin		Inosinsäure	Guanin
			Karnin usw.

Unter den angeführten Substanzen findet sich eine ganze Reihe von solchen, die entweder für sich oder auch in Form von Verbindungen ausgeprägten Geschmack aufweisen, und zwar sind alle möglichen Geschmacksqualitäten vertreten, z. B.: Die Zucker, wie Glykose und Inosit, schmecken stark süß. Inosin und die verschiedenen stickstofffreien Säuren schmecken sauer. Kreatin schmeckt stark bitter. Die Aminosäuren erregen zum Teil charakteristische Geschmacksempfindungen, und hierzu kommt noch der salzige Geschmack der in der Tabelle fehlenden anorganischen Salze.

Sieht man von dem von Thouvenel entdeckten und getauften, aber nie genau charakterisierten und ursprünglich sogar als einheitlich beschriebenen „Osmazon“, das namentlich in der früheren gastronomischen Literatur eine große Rolle spielte, ab, so fällt es auf, daß sich, wenigstens in der mir bekannten neueren Literatur, keine Arbeit findet, die sich mit der Aufklärung der eigentlichen Aromaträger der Fleischbrühe befaßt. Der Grund dafür ist wohl darin zu suchen, daß das Hauptaugenmerk der Untersuchung immer auf die Lösung der eingangs dieses Abschnitts erwähnten Fragen gerichtet war. Bis in die neueste Zeit finden sich Verfechter der Ansicht, der Fleischbrühe komme ein eigentlicher Nährwert zu, was indessen heute im allgemeinen als überwundener Standpunkt gelten kann. Auch spezielle Zubereitungen der Krankenküche wie die Uffelman n'sche Flaschenbouillon — beef-tea, fluid-beef usw. — enthalten bei 3% Extraktivstoffen höchstens 2,3% Eiweiß, also Mengen, die für die Ernährung kaum in Frage kommen. Bei den gewöhnlichen Zubereitungsformen der Fleischbrühe ist der Gehalt an Eiweiß noch geringer, da hier das geronnene, lösliche Fleischeiweiß gewöhnlich durch Abschäumen entfernt wird. Da auch den eigentlichen, nicht eiweißartigen Extraktivstoffen des Fleisches nach Rubner kein direkter Nährwert zukommt, so muß die alte Gewohnheit, größere Mahlzeiten durch eine Tasse Bouillon einzuleiten, ihren Grund in anderen Umständen haben.

Dieser Brauch findet seine Rechtfertigung darin, daß durch die Fleischbrühe der Appetit für nachfolgende Speisen angeregt wird. Die Versuche von Pawlow und seinen Schülern, daß unter dem Einfluß von Fleischbrühe ein verdauungskräftiger,

vor allem salzsäurereicher Magensaft abgeschieden wird, sind bekannt und es sei hier weiter angeführt, daß diese Wirkung nicht etwa einem einzelnen Extraktivstoffe der Fleischbrühe zukommt. Weder die Aschenbestandteile des Fleisches, noch die Albumosen, noch auch Kreatin oder Kreatinin zeigten irgendwelche Wirkung, wohl aber erwiesen sich Fleischbrühe, Fleischsaft und auch Fleischextrakt als konstante und energische Erreger des Sekretionsprozesses im Magen. Besonders erwähnenswert erscheint ein Versuch von Lobassoff¹⁾, der Fleischextrakt im Soxhlet-Apparat mit Alkohol extrahierte und zeigen konnte, daß die Sekretionserreger im Rückstand, also im alkoholunlöslichen Teile verbleiben, ein Verhalten, das, wie später gezeigt werden wird, auch den Geschmacksstoffen der Fleischbrühe zukommt. Gelang es auch der Pawlow'schen Schule nicht, bestimmte Substanzen als Träger dieser eigentümlichen Wirkung festzustellen, so konnte Bickel zeigen, daß Aminosäurengemische irgendwelcher Herkunft, wie sie ja auch in den Auszügen des Fleisches vorkommen, kräftige Erreger der Magendrüsen seien²⁾.

Die Fleischbrühe muß also heute als Genußmittel betrachtet werden, das nicht seines beschränkten Nährwertes sondern seiner anregenden Wirkung wegen eingenommen wird.

4. Untersuchung der Fleischbrühe auf Geschmacksträger. Orientierende Vorversuche.

Unter den bisher in der Fleischbrühe aufgefundenen Substanzen finden sich, wie oben erwähnt wurde, eine ganze Reihe solcher, die einen ausgeprägten und oft sogar einen charakteristischen Geschmack besitzen. Keiner dieser Körper scheint aber alleiniger Träger des eigentlichen Fleischbrühegeschmackes zu sein, und es ist als sicher anzunehmen, daß dieser Geschmack einem Gemisch von verschiedenen Körpern seine Entstehung verdankt. Theoretisch sollte es möglich sein, den Fleischbrühegeschmack durch Kombination der verschiedenen in der Fleischbrühe aufgefundenen Substanzen zu synthetisieren; praktisch dürfte aber diese Synthese, angesichts der großen Mannigfaltigkeit der Stoffe und der ziemlich unbekannten Mengenverhältnisse, in denen sie sich vorfinden, auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten stoßen.

Versuche, der Fleischbrühe die Geschmacksstoffe durch Extraktion mit irgendwelchen indifferenten Lösungsmitteln oder durch sonstige Operationen zu entziehen oder die Extraktivstoffe des Fleisches in verschiedene Fraktionen zu zerlegen, in denen etwa die Geschmacksstoffe angereichert sind oder die wenigstens von Ballaststoffen, die an der Geschmacksbildung nicht beteiligt sind, weitgehend befreit sind, erscheinen viel aussichtsvoller.

Es ist schon lange bekannt, daß die Geschmacksstoffe der Fleischbrühe außerordentlich empfindlich sind, und daß sehr leicht unangenehme Veränderungen und gar Verlust des Geschmackes eintreten. Daraus folgt, daß man an die Untersuchung dieser Fragen nur mit äußerst subtilen Methoden herangehen darf. Zur Orientierung über den später in größeren Versuchen einzuschlagenden Weg wurden zunächst die folgenden Versuche angestellt.

a) Extraktion von Fleischbrühe mit Äther, Petroläther, Chloroform. 1900 ccm frisch hergestellte Fleischbrühe wurden in dem S. 294 abgebildeten Apparat (Fig. 1) mit Äther extrahiert.

¹⁾ Archives des sciences biologiques. St. Petersbourg 1897, 5, 425.

²⁾ In diesem Zusammenhang sei auf eine sehr interessante Untersuchung von R. Staehelin (Zeitschr. f. Biologie 1907, 49, 199) hingewiesen, der zeigte, daß Fleisch und namentlich die organischen Extraktivstoffe des Fleisches auch die Diurese befördern.

Der Apparat besteht aus vier Teilen. In dem Rundkolben A, der auf ein elektrisch geheiztes Sandbad gestellt wird, befinden sich etwa 500 ccm Äther, der dauernd im Sieden erhalten wird. Die Ätherdämpfe steigen in den Hals des großen, etwa 2 l fassenden Extraktionskolbens B, der durch ein absteigendes Rohr mit Schliff mit dem Ätherkolben A verbunden ist. Der Äther gelangt weiter in den stark wirkenden Rückflußkühler C, wird dort kondensiert, tropft nun in die bis auf den Boden des Kolbens B reichende Röhre D, steigt durch die zu extrahierende Flüssigkeit empor und fließt oben, beladen mit Extraktionsgut, in das Ätherkölbchen A zurück. Die Röhre D ist von einer Glasspirale umgeben, die eine innigere Durchmischung des aufsteigenden Äthers mit der zu extrahierenden Flüssigkeit ermöglicht.

Fig. 1. Apparat zur Extraktion von Flüssigkeiten.

Nach 30-stündigem Extrahieren wurde unterbrochen und der ätherische Extrakt bei niedriger Temperatur vom Äther befreit. Es hinterblieb eine sehr kleine Menge eines gelblichen, scharf und stechend riechenden Öles, das neben Fett zweifellos Ameisensäure enthielt. Die extrahierte Fleischbrühe, die durch fünf Minuten langes Kochen vom gelösten Äther befreit wurde, hatte ihren Geschmack gegenüber einer nicht mit Äther behandelten Brühe durchaus nicht verändert. Die Geschmacksstoffe der Fleischbrühe scheinen also nicht ätherlöslich zu sein.

Ein analog mit Kaltwasserextrakt angesetzter Versuch führte zu ganz ähnlichen Resultaten und kleinere Versuche mit Petroläther und Chloroform als Extraktionsmittel zeigten, daß auch mit diesen Lösungsmitteln nicht viel zu erreichen war.

b) Extraktion mit Alkohol. Die Versuche mit diesem Lösungsmittel sind ausführlich im Abschnitt 6a beschrieben.

c) Wasserdampfdestillation der Fleischbrühe. 3 l frische Fleischbrühe wurden in einem geräumigen Kolben der Wasserdampfdestillation unterworfen. Das starke Schäumen der Flüssigkeit beim Einleiten des Wasserdampfes machte es nötig, daß zuerst ohne Wasserdampf auf etwa 2 l eingedampft werden mußte und erst dann wieder Dampf durchgeblasen werden konnte. Das Destillat war anfangs klar, später opaleszierend. Der anfangs stark an Fleischbrühe erinnernde Geruch des Destillates wurde später fade und eher säuerlich; der Geschmack war nichtssagend, schwach sauer. Die im Kolben befindliche Fleischbrühe hatte eine bräunliche Farbe angenommen, eine Erscheinung, die meist parallel geht mit der Umwandlung des Fleischbrühgeschmackes in den Geschmack des Fleischextraktes; dementsprechend war auch ihr Geschmack etwas caramelartig. Die Geschmacksstoffe sind, nach dem Ausgang dieses Versuches zu schließen, mit Wasserdämpfen nicht flüchtig.

d) Behandlung der Fleischbrühe mit Kohle. Wenn man Rotwein (Veltliner) mit $\frac{1}{20}$ seines Gewichtes Blutkohle während 4 Stunden bei Zimmertemperatur schüttelt, so ist das Filtrat wasserhell, der Geschmack gegenüber nicht behandeltem Wein fast unverändert. Bei tagelanger Behandlung mit Blutkohle wird der Geschmack des Weines bedeutend milder; vor allem scheint der Gerbstoffgehalt zurückzugehen, und die Kohle zeigt eine Gewichtszunahme, die etwa $\frac{1}{3}$ ihres ursprünglichen Gewichts

entspricht. Es erschien möglich, daß bei ähnlicher Behandlung auch der Fleischbrühegeschmack wesentliche Veränderungen erfahren und daß man vielleicht durch diese Methode die Geschmacksträger in der Kohle anreichern und ihr nachher wieder entziehen könnte. Es wurde folgender Versuch angestellt:

800 g fett- und sehnensfreies, durch den Fleischwolf getriebenes Fleisch wurden mit 1500 ccm Wasser während $2\frac{1}{2}$ Stunden in bedeckter Pfanne gekocht, die Brühe durch Abnutschen getrennt und in der Kälte nochmals glanzhell filtriert. Ausbeute 1140 ccm Fleischbrühe. Je 380 ccm dieser Brühe wurden in 3 Glaskolben gegeben und zu jeder Portion 15 ccm Toluol zur Vermeidung von bakteriellen Zersetzungen zugefügt.

Die erste Portion diente zur Kontrolle; zur zweiten Portion wurden 19 g Blutkohle (Kahlbaum) und zur 3. Portion 19 g Knochenkohle (Kahlbaum) zugesetzt. Alle 3 Kolben wurden gut verschlossen und unter öfterem Umschütteln bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 10 Tagen wurden alle 3 Portionen durch Filtration vom Toluol und der Kohle getrennt. Um die letzten Spuren von Toluol zu verjagen, wurden die 3 Proben langsam zum Sieden erhitzt: Dabei veränderte sich I gar nicht, II trübte sich stark milchig, III schäumte anfangs sehr stark, blieb aber sonst unverändert. Nach $\frac{1}{4}$ -stündigem gelinden Sieden wurde die Geschmacksprobe angestellt.

Im großen ganzen war der Geschmack der beiden mit Kohle behandelten Proben nicht sehr verschieden von dem der ursprünglichen. Probe III hatte einen leisen säuerlichen Geschmack und schien am wenigsten verändert. Probe II schmeckte deutlich reiner als Probe I, die etwas schleimig, gelatineartig schmeckte. I und III zeigten starke Biuretreaktion, II reagierte völlig negativ; es zeigte sich bei einem weiteren Versuch, daß schon nach 5-stündigem Schütteln von Fleischbrühe mit 5% ihres Gewichts Blutkohle das Filtrat völlig abiuret ist, daß also die Blutkohle imstande ist, die löslichen Fleischiweißkörper, Albumosen und Peptone zu adsorbieren.

Es zeigte sich somit, daß die Behandlung mit Blutkohle zwar nicht geeignet ist, die Geschmacksträger aus der Fleischbrühe herauszuholen, daß man aber dadurch die Brühe von den hauptsächlichsten hochmolekularen Beimengungen befreien kann.

e) Behandlung der Fleischbrühe mit Wasserstoff und Platinschwarz. Es ist bekannt, daß ungesättigte Verbindungen im allgemeinen stärker und meist auch unangenehmer riechen und schmecken, als die entsprechenden gesättigten Verbindungen. Um Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob auch in der Fleischbrühe ungesättigte Körper eine Rolle als Geschmacksstoffe spielen, wurde frische Fleischbrühe der Hydrierung mit Wasserstoff und Platinschwarz unterworfen. Dieses Verfahren gestattet die Anlagerung von Wasserstoff an ungesättigte Verbindungen bei gewöhnlicher Temperatur ohne Veränderung der chemischen Konstitution der behandelten Körper.

Der Versuch, der mit ziemlich konzentrierter Fleischbrühe vorgenommen wurde, ergab jedoch nur ganz minimale Absorption von Wasserstoff, obschon sowohl die Temperatur der Reduktionslösung von $15-70^{\circ}$ und der Druck des Wasserstoffs von einigen dm bis zu 3 m Wassersäule variiert wurden. Die Schuld an dem negativen Ausfall des Versuches lag nicht am Katalysator, denn zugefügte Ölsäure wurde in kürzester Zeit und quantitativ zu Stearinsäure hydriert, was beweist, daß das frisch bereitete Platinschwarz genügende Aktivität besaß. Der Geschmack der Fleischbrühe war nach wie vor der gleiche, und es scheint damit erwiesen, daß die Geschmacksstoffe keinen ungesättigten Charakter haben.

f) Dialyse der Fleischbrühe. Die Fleischbrühe wurde schließlich auch der Dialyse unterworfen. Ein kleiner Vorversuch hatte ergeben, daß, wenn man Fleischbrühe in einem Pergamentschlauch in destilliertes Wasser einhängt, die Geschmacksstoffe ohne weiteres durch die Pergamentmembran hindurchdiffundieren, während in dem Pergamentschlauch eine viel weniger stark schmeckende Fleischbrühe zurückbleibt. Bei einem weiteren größeren Versuche wurde die Dialyse so ausgeführt, daß nach bestimmten Zeitabschnitten das äußere Wasser ausgewechselt wurde, wodurch eine größere Anzahl von Dialysatfraktionen erhalten werden konnte.

Von diesen zeigten die ersten starken Fleischbrühgeschmack, während die späteren bis zu den letzten Fraktionen immer weniger Geschmack aufwiesen. Im Pergamentschlauch befanden sich schließlich nur noch die nicht dialysierenden, hochmolekularen Peptone, Albumosen und Eiweißkörper, die nur einen ganz faden, in nichts mehr an Fleischbrühe erinnernden Geschmack besaßen. Diese Dialyseversuche sollen später eingehende Berücksichtigung finden. An dieser Stelle sei nur so viel bemerkt, daß durch diese Methode ein Mittel gegeben ist, die Geschmacksstoffe auf reinlichere und exaktere Weise von Ballaststoffen abzutrennen, als dies durch Behandlung mit Kohle oder auch mit Fällungsmitteln wie Phosphorwolframsäure und ähnlichen Substanzen möglich ist.

5. Herstellung von Dauerpräparaten aus Fleischbrühe.

Gewöhnliche Fleischbrühe besitzt einen Gehalt von etwa 3% festen Stoffen. Das Handhaben so verdünnter Lösungen ist, besonders wenn man mit größeren Mengen arbeiten will, sehr umständlich und unbequem. Es kommt hinzu, daß die Fleischbrühe infolge ihrer Zusammensetzung für eine Reihe von Bakterien einen ausgezeichneten Nährboden bildet und daher sehr rasch einer weitgehenden Zersetzung verfällt. Es war außerdem wünschenswert, um nicht allzusehr von der zufälligen Beschaffenheit eines Fleischstückes oder der daraus gewonnenen Fleischbrühe abhängig zu sein, gleich eine größere Menge Fleisch für eine durchgehende Untersuchung in Arbeit zu nehmen. So wurde denn in zahlreichen Versuchen ein Verfahren ausgearbeitet, das ohne allzugroße Mühe gestattet, Fleischbrühe, oder besser gesagt, die in ihr enthaltenen Extraktivstoffe in größerer Menge in eine dauerhafte und nicht zersetzliche Form überzuführen.

a) Eindampfen von Fleischbrühe im Vakuum. Dieses naheliegendste und bei der Fleischextraktfabrikation in größtem Maßstabe angewendete Verfahren wurde sehr genau auf seine Anwendbarkeit geprüft. Bekanntlich werden Fleischextrakte auf die Weise gewonnen, daß man Fleischbrühe im Vakuum bis zur dicken Syrupkonsistenz eindampft und dabei die Temperatur möglichst niedrig hält. Die Geschmacksstoffe der Fleischbrühe überstehen diese Operation nicht ganz unverändert, und es wurde schon darauf hingewiesen, daß dabei der bekannte caramelartige Geschmack entsteht, durch den sich Fleischextraktlösungen leicht von frischer Fleischbrühe unterscheiden lassen.

Ohne auf alle mit dieser Methode angestellten Versuche näher einzugehen, sei nur erwähnt, daß sich dieses Verfahren sehr gut und ohne Zersetzung befürchten zu müssen, ausführen läßt, wenn man Fleischbrühe möglichst schnell unter genauer Beobachtung der Temperatur im Vakuum eindampft. Die Fleischbrühe hält beim Eindampfen vorübergehend sogar Temperaturen von über 50° ohne Geschmacksveränderung aus. Aber die Aufgabe, möglichst schnell einzudampfen, ist nur da durch-

zuföhren, wo es sich um relativ kleine Mengen von etwa 2 bis höchstens 4 l Fleischbrühe handelt. Sobald man 5, 10 und mehr Liter einzudampfen hat, ist es ganz ausgeschlossen, diese Operation ohne merklichen Schaden zu vollenden. Bei 2 Versuchen, die im größeren Maßstabe mit je 10 kg Fleisch ausgeführt wurden, entstanden Präparate, die stark nach Buttersäure rochen und äußerst bitter schmeckten, ohne daß dafür eine andere Ursache als die zu lange Dauer des Eindampfens hätte ausfindig gemacht werden können.

Zur Gewinnung größerer Mengen von Fleischbrühe-Dauerpräparaten erschien dieses Verfahren somit als zu umständlich, da man die Fleischbrühe in vielen kleinen Portionen hätte gewinnen und eindampfen müssen, um Veränderungen der Geschmacksstoffe zu vermeiden.

b) Konzentrieren von Fleischbrühe mit Hilfe von Gelatine und Leim. Zwei Versuche, das vor kurzem von der Scheidemandel Aktien-Gesellschaft genommene D.R.P. 303 671, Kl. 53e vom 12. Mai 1915 der Konzentrierung von Fleischbrühe nutzbar zu machen, zeigten ein ebenfalls nicht gerade verlockendes Resultat. Nach diesem Verfahren soll es möglich sein, Milch und ähnliche wässrige Flüssigkeiten und Suspensionen dadurch zu konzentrieren oder auszutrocknen, daß man sie mit Gelatine- oder Leimperlen bei gewöhnlicher Temperatur versetzt. Die Perlen saugen infolge ihres Quellungsvermögens Wasser auf; sie werden nach bestimmter Zeit von der anhaftenden, konzentrierten Flüssigkeit durch Absaugen oder Ausschleudern getrennt, für sich getrocknet und hierauf wieder zu gleichem Zwecke verwendet.

An Stelle der Perlen wurde einmal zerschnittene, gewöhnliche Gelatine (Silberdruck, Kahlbaum), das andere Mal stark zerschnittener Kölner Leim verwendet.

500 ccm Fleischbrühe vom spezifischen Gewicht 1,008 wurden mit 25 g zerkleinerter Gelatine versetzt und 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde von der Gelatine abgenutscht, die Flüssigkeitsmenge betrug noch 355 ccm, ihr spezifisches Gewicht 1,012. Die Gelatine wurde im Vakuum-Trockenschrank rasch getrocknet und der konzentrierten Fleischbrühe wieder zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden hatte das Volumen der Flüssigkeit um weitere 145 ccm abgenommen, das spezifische Gewicht war auf 1,014 gestiegen. Der Vorgang wurde mit der aufs neue getrockneten Gelatine noch ein drittes Mal wiederholt. Es blieben schließlich 115 ccm konzentrierte Fleischbrühe vom spezifischen Gewicht 1,020.

Ein Versuch, der mit gleichen Mengenverhältnissen mit Kölner Leim angestellt worden war, ergab fast noch bessere Resultate, und es schien, als ob der Leim im Vergleich zur Gelatine ein größeres Absorptionsvermögen besaß.

Zwei Beobachtungen führten jedoch zu der Überzeugung, daß auch diese Methode, so elegant sie anfänglich auch schien, nicht zur definitiven Verwendung herangezogen werden konnte. Einmal zeigte sich der Nachteil, der auch in der Scheidemandel'schen Patentschrift aufgeführt ist, daß die Quellkörper nicht nur Wasser aufsaugen, sondern auch befähigt sind, bis zu einem gewissen Sättigungszustande, der jedenfalls den Gesetzen der Osmose entspricht, Milchzucker, Salze u. dergl. aufzunehmen. Dadurch entstehen, namentlich bei der erstmaligen Verwendung der Perlen Verluste an solchen Verbindungen, von denen auch die allem Anschein nach niedrigmolekularen Geschmacksstoffe betroffen werden können.

Ein weiterer Nachteil, der in der Patentschrift nicht angeführt ist, zeigte sich darin, daß die Quellkörper nicht einseitig Wasser aufsaugen, sondern daß sie sich umgekehrt auch in Wasser zu lösen vermögen. Stellt man entsprechende Versuche

mit reinem Wasser an, so zeigt schon die nach sehr kurzer Zeit von den Quellskörpern abgesaugte Flüssigkeit starke Biuretreaktion. Durch diesen Vorgang würden also neue, unerwünschte Stoffe in die Fleischbrühe gebracht, die ihr außerdem noch einen unangenehmen, leimigen Geschmack erteilen. Wegen dieser lästigen Nebenerscheinungen wurde auch dieses Verfahren verlassen.

c) Konzentrieren von Fleischbrühe durch Ausfrieren. Ein Verfahren, das gestattet, die Fleischbrühe ohne Einwirkung höherer Temperaturen und somit ohne Beeinflussung der Geschmacksstoffe weitgehend zu konzentrieren, wurde schließlich in dem schon hier und da im Großbetrieb zur Anwendung kommenden Ausfrieren gefunden. Es diente zur Herstellung eines Fleischbrühe-Trockenpräparates von vorzüglicher Qualität und sei daher eingehend geschildert.

10 kg mageres Rindfleisch (Keule) wurden in dünne Streifen geschnitten, sorgfältig von anhaftendem Fett, Sehnen und Bindegewebe befreit und zweimal durch den Fleischwolf getrieben, wobei darauf geachtet wurde, daß auch der hierbei austretende Fleischsaft nicht verloren ging. Das Gewicht des nach dieser Bearbeitung zur Verwendung gelangenden Fleisches samt Saft betrug noch etwa 7400 g. Es wurde in 3 Portionen in je 4 l siedendes Wasser gegeben, das sich in einem aluminieren Dampfkochkessel befand. Nach dem ersten Aufwallen wurde ein ebenfalls aluminierter, flacher Deckel mit Rückflußkühler dicht aufgesetzt und nun während 2½ Stunden in gelindem Sieden erhalten. Nach dieser Zeit wurde die Brühe durch große Steingegensichten abgesaugt und das ausgekochte Fleisch gut ausgepreßt. Es wog noch etwa 4000 g und wurde mit der gleichen Menge Wasser nochmals ausgezogen und schließlich mit 1 l kochendem Wasser nachgewaschen, um ja nichts zu verlieren und die Ausbeute möglichst zu erhöhen.

Die so erhaltenen etwa 17 l Fleischbrühe wurden ruhig erkalten gelassen; in der Regel zeigten sich nur ganz wenige Fettaggen, die gut entfernt werden konnten. Die Brühe, deren spezifisches Gewicht anfangs etwa 1,003 betrug, wurde nun in großen emaillierten Kesseln in Eis-Kochsalzmischungen langsam zum Gefrieren gebracht. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß sich keine größeren Eisklumpen bildeten, die vielleicht größere Mengen von Extraktivstoffen hätten einschließen können. Durch ständiges Bewegen und Rühren der Brühe wurde schließlich eine sulzartige Masse erhalten, in der das ausgefrorene Wasser schneeartig verteilt war. Anfänglich wurde die konzentrierte Brühe durch Kolieren vom Schnee getrennt. Später erwies es sich als vorteilhafter, die Masse in einer mittelgroßen Laboratoriumszentrifuge auszuscheidern. Durch dieses Verfahren ließ sich die dem Schnee noch anhaftende Brühe fast restlos gewinnen. Beim erstmaligen Ausfrieren wurden so aus 17 l Brühe 10—11 l Wasser entfernt; das spezifische Gewicht der konzentrierten Brühe war in der Regel auf 1,018 gestiegen.

Die konzentrierte Brühe wurde nun ein zweites und eventuell ein drittes Mal der gleichen Operation unterworfen und schließlich resultierten etwa 2000 ccm konzentrierter Brühe vom spezifischen Gewicht 1,020—1,023. Der jedesmal abgetrennte Schnee wurde langsam wieder aufgetaut, und da er noch geringe Mengen von Fleischbrühe enthielt, wurde die so gewonnene, sehr verdünnte Fleischbrühe zum Ausziehen neuer Mengen Fleisch verwendet.

Auf diese Weise wurden 36,77 kg Fleisch (aus ursprünglich 50 kg) mit einer Gesamtmenge von etwa 30 l Wasser nacheinander auf konzentrierte Fleischbrühe verarbeitet. Die aus jeder Portion erhaltene konzentrierte Brühe wurde ohne Zeit-

verlust in Portionen von etwa 2 l in geräumigen Rundkolben im Vakuum unter etwa 30 mm Quecksilberdruck und bei einer Flüssigkeitstemperatur von 30 bis maximal 35° (eingetauchtes Thermometer) bis fast zur Sirupkonsistenz eingedampft. Diese Operation wurde, da sie sehr rasch ausgeführt wurde, stets gut überstanden. Bei einigen Portionen zeigte sich oft starkes Schäumen, als dessen Ursache noch vorhandenes Fett erkannt und durch ein- bis zweimaliges Ausschütteln mit Äther beseitigt wurde.

Der schon ziemlich dickflüssige Sirup wurde, um ihn vollständig zu gewinnen, schließlich aus den Rundkolben in Vakuumdestillierapparate gebracht, die aus flachen Porzellanschalen mit aufgeschliffener Glasglocke bestanden. Hier wurde nun, unter denselben Druck- und Temperaturverhältnissen das Wasser nach Möglichkeit entfernt. Der resultierende zähe Sirup wurde durch kräftiges Rühren mit einem Glasstab mit feinen Luftbläschen durchmischt und in denselben Schalen in große Exsikkatoren, die mit Phosphorpentoxyd beschickt waren, gestellt. Diese wurden allmählich und schrittweise immer stärker evakuiert und schließlich mit Hilfe einer rotierenden Kapselpumpe nach Gaebe unter Hochvakuum gesetzt. Die im Sirup befindlichen Luftbläschen dehnten sich hierbei naturgemäß stark aus und verwandelten den Sirup in eine schaumige, blasige Masse, die infolge ihrer lockeren Beschaffenheit relativ rasch trocknete und sich besser pulverisieren ließ, als wenn der Sirup zu einer glasigen Masse erstarrt wäre. Immerhin dauerte es trotz ständiger Erneuerung des Phosphorpentoxyds doch einige Wochen, bis die Masse gewichtskonstant geworden war.

Das Pulverisieren bereitete trotz der schaumigen Beschaffenheit der Masse nicht geringe Schwierigkeiten. Die trockene Fleischbrühe ist geradezu erstaunlich hygroskopisch und es erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen und vor allem große Übung, um den fest gewordenen Schaum mit genügender Schnelligkeit in den mit Gummischutzhülle versehenen Mörser zu bringen. Um ein einheitliches Produkt zu erhalten, wurde das Pulverisierte durch ein engmaschiges Sieb gesiebt, das im Sieb zurückgebliebene nach erneutem Trocknen im Hochvakuum wieder pulverisiert, gesiebt usw.

Schließlich wurden aus 36,77 kg Fleisch 1394 g bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Fleischbrühepräparat erhalten, was einer Ausbeute von 3,79% des angewandten Fleisches entspricht. 1 g des Pulvers entsprach somit 26,4 g frischem Fleisch oder etwa 50 ccm frischer Fleischbrühe.

Das trockene Präparat, das die sämtlichen Extraktivstoffe des Fleisches enthielt, hatte das Aussehen eines staubfeinen, schwach gelbbraunlich gefärbten Pulvers, das schon nach kurzem Stehen an der Luft zu einem Sirup zerfloß. In zugeschmolzenen oder sehr sorgfältig mit Paraffin verschlossenen Gefäßen ließ es sich anstandslos monate- und jahrelang aufbewahren. Bakterielle Zersetzungen oder Bakterienwachstum auf der trockenen Masse waren nie zu erkennen, ähnlich wie auch Fleischextrakt jahrelang in nicht annähernd so gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt werden kann.

Löste man das Pulver bald nach der Zubereitung in der entsprechenden Menge Wasser auf, so erhielt man eine Fleischbrühe von äußerst angenehmem und reinem Geschmack, der in nichts demjenigen frisch bereiteter Fleischbrühe nachstand. Eine Geschmacksprobe, die 14 Monate nach Herstellung des Präparates vorgenommen wurde, zeigte, daß sich der Geschmack mit der Zeit verändert und nicht mehr dem Geschmack frischer, sondern eher demjenigen eingedampfter Fleischbrühe entspricht und in dieser Hinsicht an den Geschmack von Fleischextrakt erinnert.

6. Zerlegung der Fleischbrühe in einzelne Fraktionen.

Dieses Fleischbrühe-Trockenpräparat wurde nun zu weiteren Untersuchungen verwendet. Nachdem die früher geschilderten Versuche, die Geschmacksstoffe durch Extraktion mit Äther, Petroläther, Chloroform, Wasserdampf zu isolieren oder von Ballaststoffen zu befreien, kein positives Ergebnis hatten, wurde noch ein weiteres, allgemeiner verwendbares Lösungsmittel, nämlich absoluter Alkohol, in Anwendung gebracht. Die Wahl dieses Lösungsmittels wurde vor allem durch die Tatsache veranlaßt, daß sich fast alle zerfließlichen oder hygroskopischen Salze (mit Ausnahme der Pottasche) in absolutem Alkohol lösen, während die nicht zerfließlichen Salze darin unlöslich oder doch sehr schwer löslich sind. Durch diese Behandlung war also auch die Möglichkeit gegeben, das Fleischbrühe-Trockenpräparat von den, seine unangenehmen Eigenschaften bedingenden, stark hygroskopischen Bestandteilen zu befreien.

a) Extraktion des Trockenpräparates mit absolutem Alkohol.

Der zur Extraktion verwendete absolute Alkohol wurde durch Destillation von gewöhnlichem 95 %-igem Alkohol über metallischem Calcium, später auch durch zweimalige Destillation über ungelöshtem Kalk hergestellt. Anfangs wurde versucht, die Extraktion in einem gewöhnlichen Soxhlet'schen Apparat vorzunehmen. Es zeigte sich aber sofort, daß die bei dieser Methode unumgängliche, relativ hohe Temperatur genügt, um die Geschmacksstoffe der Fleischbrühe weitgehend in dem Sinne zu verändern, daß das extrahierte Produkt einen stark brändeligen Geschmack aufweist.

Andererseits wurde festgestellt, daß die Extraktion bei Zimmertemperatur sehr lange Zeit in Anspruch nimmt, und es wurde deshalb der Mittelweg, die Extraktion mit absolutem Alkohol bei etwa 40° gewählt.

Nach verschiedenen Vorversuchen wurde folgendes Vorgehen als bestes befunden:

Das Fleischbrühpulver wurde in Portionen von etwa 450 g möglichst rasch, um Wasseranziehung zu vermeiden, in eine geräumige, etwa 5—6 l fassende, starkwandige Flasche gebracht, sofort mit 4 l absolutem Alkohol übergossen, und außerdem wurden etwa 100 Porzellankugeln (Durchmesser 1½ cm) zugegeben. Die Kugeln hatten den Zweck, ein Zusammenballen des Fleischbrühpulvers zu verhindern und nach Möglichkeit die Korngröße noch weiter zu verkleinern. Nun wurde das Ganze im Wasserbad vorsichtig auf 40° erwärmt, hierauf mit einem Gummistopfen luft- und wasserdicht verschlossen und durch Drahtverschluß gesichert. Die Flasche wurde auf eine Schüttelmaschine mit Bandaufhängung gebracht, die in eine große, mit Wasser gefüllte Blechwanne eintauchte, sodaß die Flasche fast völlig mit Wasser bedeckt war. Das Wasser wurde elektrisch auf eine Temperatur von 35—40° erwärmt und nun die Schüttelmaschine in Tätigkeit gesetzt. Über Nacht wurde vorsichtshalber weder geschüttelt, noch erwärmt. Durchschnittlich wurde eine Portion 20—30 Stunden geschüttelt und hierauf durch Filtration oder besser durch Dekantation vom Ungelösten abgetrennt.

Die Filtration wurde, um jeden Zutritt von Luftfeuchtigkeit zu vermeiden, was natürlich sofort die Löslichkeitsverhältnisse geändert hätte, in dem nachstehend skizzierten Apparat (Fig. 2) vorgenommen. Dieser Apparat hatte den weiteren Vorteil, daß nur ganz geringe Teile des Extraktionsgutes aus der Schüttelflasche herausgelangen.

Der Gummistopfen der Schüttelflasche wurde sorgfältig entfernt und durch einen bereit gehaltenen zweiten, einfach durchbohrten Stopfen ersetzt, durch den ein ziemlich weites Glasrohr bis fast zum Boden der Flasche ging. Dieses Glasrohr war durch ein kurzes Stück Gummischlauch elastisch mit einem Dreiweghahn verbunden,

sodaß der Flascheninhalt so rasch wie möglich wieder abgeschlossen werden konnte. Die Flasche wurde umgekehrt — der Stopfen muß natürlich sehr gut sitzen, damit er nicht durch das Gewicht des Flascheninhalts herausgedrückt wird; andererseits muß sich aber auch das Glasrohr, das durch den Stopfen führt, leicht bewegen lassen — und der Dreiweghahn, wie dies aus der Zeichnung ersichtlich ist, mit einem Scheidetrichter verbunden. Die dritte Öffnung des Hahns, die es ermöglicht, Luft oder Waschalkohol in die Schüttelflasche eintreten zu lassen, war gewöhnlich mit einem Chlorcalciumrohr verbunden, dem die Aufgabe zufiel, die eintretende Luft von Feuchtigkeit zu befreien. Im Scheidetrichter befand sich ein ziemlich dichtes Faltenfilter zu dem Zwecke, die etwa beim Abdekantieren mitgerissenen feinsten Teilchen des Fleischbrühpulvers zurückzuhalten. Der Scheidetrichter trug ebenfalls einen Gummistopfen, durch dessen zweite Bohrung ein mit einem Chlorcalciumrohr verbundenes Glasrohr ging, das es seinerseits ermöglichte, nach Bedarf trockene Luft in den Scheidetrichter eintreten zu lassen. Mittels eines dritten Gummistopfens war der Ausfluß des Scheidetrichters auf einer Saugflasche aufmontiert, die mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe (mit Rückschlagventil) evakuiert werden konnte. In die Vakuumleitung war zur Absorption von immer vorhandenen Wasserdämpfen ein Rohr mit geschmolzenem Natriumsulfat eingeschaltet.

Die Schüttelflasche ruhte auf einem an festem Stativ befestigtem, beweglichem Ring und konnte nach Belieben gehoben oder gesenkt werden. Mit der Dekantation wurde erst begonnen, nachdem sich auch die feinsten Fleischbrühpartikel zu Boden gesetzt hatten und die darüber stehende alkoholische Lösung glanzhell geworden war, wozu meist eine Stunde erforderlich war. Nun wurden die beiden Chlorcalciumröhren geschlossen, die Saugflasche leicht evakuiert und die vorher geschlossenen Verbindungen mit dem Scheidetrichter und der Schüttelflasche geöffnet. Durch den Dreiweghahn floß die alkoholische Lösung in langsamem Strom in den Scheidetrichter, passierte das Filter und gelangte in die Saugflasche. Mit fortschreitendem Sinken des Flüssigkeitsspiegels wurde die Schüttelflasche gehoben, bis die Mündung des Glasrohrs unmittelbar über dem Bodensatz von Fleischbrühpulver stand. Hierbei, wie auch bei allen übrigen Manipulationen, mußte sehr sorgsam verfahren werden, da die geringste Erschütterung das fein verteilte Pulver aufwirbelte und zu schwer absitzenden Trübungen Anlaß gab. In der Schüttelflasche entstand allmählich ein starkes Vakuum, das nach dem Absaugen der Hauptmenge der alkoholischen Lösung und nach dem Emporschieben des Rohres dazu benutzt wurde, einige 100 ccm frischen, absoluten Alkohol einzusaugen. Zu diesem Zwecke wurde das Chlorcalciumrohr des Dreiweg-

Fig. 2. Apparat zur Filtration unter Luftabschluß.

hahnes abgenommen, an seine Stelle ein langes Glasrohr in die Vorratsflasche mit Alkohol getaucht und durch entsprechende Drehung des Hahnes das gewünschte Quantum Alkohol eingesaugt. Dann wurde das Chlorcalciumrohr wieder aufgesetzt und schließlich bis zum Druckausgleich trockene Luft in nicht zu schnellem Strom eintreten gelassen. Das Fleischbrühpulver wurde mit dem Waschkalkohol gut durchgeschüttelt, absitzen gelassen und nun auch der Waschkalkohol auf gleiche Weise, wie soeben geschildert, abdekantiert. Bei sorgfältig geleiteter Operation fanden sich im Faltenfilter nur Spuren des Fleischbrühpulvers, die vernachlässigt werden konnten. Das Filtrat war vollkommen klar.

Nun wurde die neuerdings evakuierte Schüttelflasche wieder mit trockener Luft gefüllt, der Stopfen samt Glasrohr abgenommen, 4 l frischer, absoluter Alkohol hinzugefügt, auf 40° erwärmt, dicht verschlossen und aufs Neue bei 40° geschüttelt.

In der Regel genügte es, wenn dreimal hintereinander mit Alkohol extrahiert wurde. Der letzte alkoholische Extrakt enthielt gewöhnlich nur noch so wenig feste Stoffe, daß sich eine vierte Extraktion nicht mehr lohnte. Doch wurde immerhin nach der letzten Dekantation das extrahierte Fleischbrühpulver mit beträchtlichen Mengen absoluten Alkohols durchgeschüttelt und zum Schluß durch Abnutschen und Auspressen von allen Resten anhaftenden alkoholischen Extrakts befreit. Die letzten Reste Alkohol wurden im Hochvakuum verjagt.

Der in absolutem Alkohol unlösliche Anteil des Fleischbrühpulvers stellte ein lockeres Pulver von nur schwach gelblicher Farbe dar, das an der Luft keine Feuchtigkeit mehr anzog und also seine früheren hygroskopischen Eigenschaften völlig verloren hatte. Die Ausbeute betrug, bei Anwendung von 885 g trockenem Fleischbrühpulver 601 g alkoholunlöslichen Anteil, somit 67,91%.

Die absolutalkoholischen Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur bis zur Sirupdicke eingedampft. Bei ziemlich hoher Konzentration wurde dabei eine kleine Menge von Krystallen erhalten (23,05 g) und durch Absaugen von der Mutterlauge getrennt. (Über ihre Zusammensetzung vergl. den Abschnitt 8, 17.) Der Sirup konnte nicht zum Erstarren gebracht werden; er wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Er war von ziemlich dunkler, brauner Farbe und besaß einen eigentümlichen, säuerlichen Geruch. Die Ausbeute von 318,8 g aus 885 g trockenem Fleischbrühpulver entsprach 36,0%.

Schon die Vorversuche hatten mit aller Deutlichkeit ergeben, daß durch die Alkoholbehandlung bei 40° die Geschmacksträger nicht oder doch nur sehr wenig beeinflußt werden; sie finden sich im alkoholunlöslichen Teil, während der Rückstand des Alkoholextraktes einen stark sauren Geschmack aufweist. Die entscheidende Geschmacksprobe sei hier etwas näher geschildert. Sie sollte die Bestätigung dafür erbringen, daß die Geschmacksstoffe der Fleischbrühe bei der Behandlung des festen Fleischbrühpulvers mit absolutem Alkohol nicht in dieses Lösungsmittel übergehen, sondern ungelöst zurückbleiben, sodaß also bei der Suche nach Geschmacksträgern vor allem der alkoholunlösliche Teil der festen Fleischbrühe zu untersuchen wäre.

Um die Geschmacksprobe in den richtigen Mengenverhältnissen vorzunehmen, hat man sich folgendes zu vergegenwärtigen:

A) 100 g festes Fleischbrühpulver

mit absolutem Alkohol bei 40° behandelt, ergeben:

32,1 g Gesamt-Alkohollösliches; C) 67,9 g Alkoholunlösliches.

Von dem Gesamt-Alkohollöslichen können durch Krystallisation abgetrennt werden:

B₁) 2,6 g Krystalle (Kaliumchlorid, Kreatin usw.)

und es bleiben

B) 29,5 g Alkohollösliches.

B + B₁ und C müssen, wenn sie im gleichen Verhältnis, wie sie abgetrennt wurden, zusammengegeben werden, wieder A ergeben. Erweist sich der Geschmack dieser zusammengesetzten Fleischbrühe als gleich mit demjenigen des Ausgangsmaterials, so soll dies als Beweis dafür gelten, daß die Behandlung der festen Fleischbrühe mit absolutem Alkohol die Geschmacksträger unbeeinflußt läßt.

Es wurden also die folgenden fünf Lösungen auf ihren Geschmack geprüft:

- I. 5,0 g feste Fleischbrühe in 200 ccm Quellwasser (in der Annahme, daß gewöhnliche Fleischbrühe etwa 2,5 % Trockensubstanz enthält).
- II. 3,40 g alkoholunlösliche Fleischbrühe in 200 ccm Wasser.
- III. 0,13 g Krystalle aus Fleischbrühe in 200 ccm Wasser.
- IV. 1,47 g alkohollösliche Fleischbrühe in 200 ccm Wasser.
- V. 3,40 g alkoholunlösliche Fleischbrühe
0,13 g Krystalle
1,47 g alkohollösliche Fleischbrühe } in 200 ccm Wasser.

Lösung I zeigte Fleischbrühgeschmack, allerdings nicht den Geschmack frischer, sondern eingedampfter Brühe und erinnerte in dieser Hinsicht an Fleischextrakt.

Lösung II enthielt die hauptsächlichsten Geschmacksstoffe; sie schmeckte aber weniger intensiv als Lösung I.

Lösung III konnte sofort ausgeschaltet werden; sie schmeckte leicht bitter und schwach salzig.

Lösung IV reagierte und schmeckte schwach sauer; sie wurde mit etwas Natriumbicarbonat auf ganz schwach alkalische Reaktion gebracht. Ihr Geschmack war auch jetzt noch, wie vorher schon, widerlich, brändelig. Außerdem enthielt aber diese Fraktion eine Säure, die bei Lösung II bestimmt zu fehlen schien und die vielleicht den Geschmack der Lösung II heben und auf die Stufe von Lösung I (Fleischbrühe) bringen würde, wenn man sie bei Lösung II zusetzen könnte.

Lösung V (Synthetische Fleischbrühe) sollte genau den Geschmack von Lösung I haben. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Verschiedenheit, da ein fremder, unangenehmer Geschmack hineingekommen zu sein schien. Da es der gleiche, etwas widerliche Geschmack wie bei Lösung IV war, so schien er bei der Behandlung der festen Fleischbrühe mit Alkohol entstanden zu sein.

Die Behandlung mit absolutem Alkohol bei 40° zeigte sich also doch nicht ganz so unbedenklich, wie zuerst angenommen worden war. Es ist möglich, daß bei dieser Behandlung eine Art von Alkoholyse sich vollzieht, welcher dann der soeben geschilderte unangenehme Geschmack zu verdanken ist. Es konnte nicht entschieden werden, ob durch diesen Vorgang die eigentlichen Geschmacksträger betroffen werden oder ob irgend ein vorher geschmackloser Körper durch die Alkoholyse verändert wird und dann Anlaß zu dieser Geschmacksänderung gibt.

Weiterhin zeigte sich, daß durch die Alkoholbehandlung aus der ursprünglichen Fleischbrühe eine Säure oder doch ein Körper mit säuerlichem Geschmack extrahiert wurde, der nun in Lösung II fehlte, der aber anscheinend zum richtigen, vollen Fleischbrühgeschmack gehört.

Immerhin konnte als Ergebnis dieser Geschmacksprobe gebucht werden, daß sich die Hauptmenge der Geschmacksstoffe im alkoholunlöslichen Teile vorfand und

daß im alkohollöslichen Teil nach Säuren oder sauer schmeckenden Körpern zu suchen sei, die den an sich schon guten Geschmack von Lösung II erhöhen könnten.

b) Dialyse des in absolutem Alkohol unlöslichen Teiles.

Es war anzunehmen, daß der in Alkohol unlösliche Rückstand auch jetzt noch ein sehr kompliziertes Gemisch von verschiedenartigen Körpern darstellte und es wurde vor allem danach getrachtet, auf möglichst behutsame Weise noch weitere Stoffe, die sich nicht an der Geschmacksbildung beteiligen, daraus zu entfernen. Schon früher (s. Abschnitt 4f) war gezeigt worden, daß man sowohl durch Dialyse, wie auch durch Behandlung mit Blutkohle die hochmolekularen Stoffe abtrennen kann. Es wurde schon damals (bei der Behandlung der ursprünglichen Fleischbrühe) der Dialyse als dem reinlicheren, exakteren Verfahren der Vorzug gegeben, das es außerdem ermöglicht, die verschieden schnell durch die Membran diffundierenden Körper in einzelnen Fraktionen aufzufangen. Nach verschiedenen Vorversuchen wurde folgendes Verfahren ausgebildet:

Ein kreisförmig geschnittenes, sorgfältig ausgesuchtes Pergamentpapier wurde mit der Peripherie um eine kurze, ziemlich weite und nach unten verjüngte Glasröhre gefältelt und mit einer starken Schnur festgebunden. Auf diese Weise entstand ein Beutel, dessen Inhalt je nach der Größe des Papiers von 1—3 l variiert werden konnte. Die Größe des Beutels war selbstverständlich reichlich zu bemessen, da während der Dialyse nicht nur Stoffe aus dem Beutel hinaus, sondern auch reines Wasser in den Beutel hinein diffundierte und sich also das Volumen der im Beutel befindlichen Lösung beträchtlich vermehrte.

Der Beutel wurde mit einer wässerigen Lösung des alkoholunlöslichen Teiles beschickt, an der Schnur aufgehängt und in ein geräumiges Gefäß mit destilliertem Wasser eingetaucht. War die zu dialysierende Lösung allzu konzentriert, so mußte durch schwaches Erwärmen des umgebenden Wassers auf etwa 30° dafür gesorgt werden, daß keine Gelatinierung eintrat, die den Erfolg der Dialyse beeinträchtigt hätte. Das Erwärmen geschah leicht und je nach Bedarf durch eine kleine Dampfschlange; außerdem wurde durch kräftiges Rühren mit Hilfe eines Elektromotors dafür gesorgt, daß mindestens die äußere Flüssigkeit ständig in Bewegung war. Nach bestimmten Zeiträumen wurde das äußere Wasser abgehebert und durch frisches ersetzt, und zwar so lange, als überhaupt noch nennenswerte Mengen von festen Körpern die Pergamentmembran passierten. Da diese Versuche oft recht lange dauerten, wurde durch reichlichen Toluolzusatz die sonst bald eintretende bakterielle Zersetzung des Fleischbrühepräparates hintangehalten.

Die Dialysatlösungen wurden jeweils für sich im Vakuum bei möglichst geringer Temperatur eingedampft, im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd völlig getrocknet und die Rückstände pulverisiert. Beim Eindampfen, namentlich der ersten Fraktionen, schieden sich hin und wieder Krystalle aus, die jedesmal durch Filtration abgetrennt und für sich gereinigt und getrocknet wurden.

Ein kleiner Vorversuch hatte z. B. folgendes Resultat:

51,3 g alkoholunlösliches Fleischbrühpulver wurden in 500 ccm destilliertem Wasser gelöst und in einen vorher auf Dichtigkeit genau geprüften Pergamentbeutel von etwa 1 l Inhalt eingefüllt. Der Beutel wurde in einen 4 l fassenden Filtrierstutzen eingehängt, der Stutzen mit 3 l Wasser gefüllt und nun unter kräftigem Rühren bei Zimmertemperatur mit der Dialyse begonnen. Nach 6-stündigem Rühren

wurde das äußere Wasser ausgewechselt, über Nacht stehen gelassen, am Morgen noch 2—3 Stunden gerührt, das Wasser wieder ausgewechselt usf. Im ganzen wurde das Wasser siebenmal erneuert, jede Dialysatfraktion für sich im Vakuum zur Trockne gebracht und gewogen. Die ersten Fraktionen schieden beim Konzentrieren geringe Mengen von Krystallen aus, die abgetrennt und für sich untersucht wurden. Sie bestanden aus wechselnden Mengen von Phosphaten, Kreatin und Kreatinin.

Im Dialysierbeutel befand sich schließlich nur noch ein Gemenge von hochmolekularen Körpern, die nicht dialysierten. Das Volumen der inneren Flüssigkeit hatte um 330 ccm zugenommen und betrug am Ende 850 ccm. Auch diese Lösung wurde nach Beendigung der Dialyse zur Trockne verdampft und gewogen. Den Verlauf und die erzielten Ausbeuten bei dem soeben geschilderten Versuch zeigt am besten die folgende Tabelle:

Fraktion Nr.	Wasser- menge ccm	Dauer der Dialyse		Ausbeute an Dialysat			
		im ganzen Std.	wovon gerührt Std.	absolut		in % der angewandten Menge %	je Stunde g
				Gesamt- menge g	wovon Krystalle g		
1	3000	6	6	4,00	0,52	7,8	0,667
2	3000	16	2,5	5,85	0,60	11,4	0,366
3	3000	24	9	3,65	0,23	7,1	0,152
4	3000	24	9	3,04	—	5,9	0,127
5	3000	24	9	2,30	—	4,5	0,096
6	3000	28	13	2,10	—	4,1	0,075
7	3000	44	—	2,70	—	5,3	0,061
8	3000	72	27	3,00	—	5,8	0,042
Summe der Dialysate	24000	238	76	26,64	1,35	51,9	—
Nicht- dialysiert	830	238	76	22,01	—	42,9	—
Verlust	—	—	—	2,65	—	5,2	—
Summe	—	238	76	51,30	1,35	100,0	—

Es wird aus der Tabelle ersichtlich, daß der Verlauf der Dialyse ein sehr regelmäßiger ist (s. namentlich die letzte Spalte), und daß die Menge der die Pergamentmembran passierenden Stoffe in der Zeiteinheit allmählich so klein wird, daß sich ein weiteres Fortführen des Versuches erübrigt.

Sämtliche Dialysate zeigten negative Biuret- und Millon'sche Reaktion. Sie stellten in trockenem Zustand ganz schwach gefärbte, gelblichbraune Körper dar, die sich in Wasser spielend auflösten, aber nicht im mindesten hygroskopisch waren.

Die Geschmacksprobe wurde mit $\frac{1}{2}$ 0/0-igen Lösungen vorgenommen; sie wurde wegen ihrer Wichtigkeit mehrere Male wiederholt und ergab im wesentlichen folgendes:

Die erste Dialysatfraktion schmeckt sehr gut, etwas süßlich, aber nicht wie Fleischextrakt. Sie enthält jedenfalls die wichtigsten Geschmacksstoffe und soll weiter untersucht werden. Die vierte Dialysatfraktion schmeckt gänzlich bedeutungslos und braucht kaum mehr berücksichtigt zu werden. Die achte Dialysatfraktion schmeckt wieder ziemlich stark. Ihr Geschmack ist aber brenzlich, hornig und erinnert an Fleischextrakt.

Die Lösung der nicht dialysierenden, hochmolekularen Körper (Peptone, Albumosen, Eiweiß usw.) schmeckt schwach säuerlich, sonst aber ganz bedeutungslos.

Nach den günstigen Ergebnissen dieses und anderer Vorversuche wurde nun auch die Hauptmenge des alkoholunlöslichen Fleischbrühepulvers in einem entsprechend großen Pergamentbeutel der Dialyse unterworfen. 503 g Alkoholunlösliches wurden in 5 l Wasser gelöst und in 2 Portionen gegen je 15 l destilliertes Wasser dialysiert. Temperatur etwa 30°. Da es, wie soeben gezeigt wurde, nur auf die Gewinnung des zuerst dialysierenden Anteils ankam, wurde die Dialyse nach etwa 20-stündigem Rühren und 50-stündigem Stehen unterbrochen, die Dialysate wurden sofort im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur konzentriert und vereinigt. Sie wurden beim Hauptversuch nicht bis zur völligen Trockne gebracht, sondern nach Auffüllung auf ein bestimmtes Volumen (1 l) zur Ausführung der quantitativen Analysen benutzt. Die im Pergamentbeutel befindliche Lösung der noch nicht dialysierten und der nicht dialysierbaren Stoffe wurde in einer großen Standflasche unter Toluol aufbewahrt.

Aus der Trockensubstanzbestimmung dieses ersten Dialysates ergab sich eine Ausbeute an 142,56 g Trockensubstanz. Dazu kamen 17,2 g Krystalle, die sich beim Konzentrieren ausgeschieden hatten, und 9,12 g trockene Rückstände, die aus den zur Konzentrierung verwendeten Rundkolben, Filtern usw. zusammengespült worden waren. Die Gesamtausbeute an erstem Dialysat betrug also 168,9 g = 37,33 % des angewandten alkoholunlöslichen Fleischbrühepulvers oder 26,09 % des ursprünglichen Fleischbrühepulvers.

7. Allgemeine Eigenschaften der einzelnen Fraktionen.

a) Trocken es Fleischbrühepulver. Das Pulver reagierte, in wenig Wasser gelöst, gegen Lakmus neutral, es zeigte starke Biuretreaktion und sehr deutliche Millon'sche Reaktion. Die Fehling'sche Reaktion fiel negativ aus, dadurch war die Abwesenheit von reduzierenden Zuckern erwiesen. Die Prüfung auf Stickstoff, Schwefel und Phosphor verlief natürlich positiv. Auf dem Platinblech verascht, hinterließ das Pulver einen ansehnlichen, anorganischen Rückstand in Form einer farblosen Schmelze, die der nicht leuchtenden Bunsen-Flamme eine schwache Natrium- und eine sehr starke Kaliumfärbung erteilte.

Bei der Herstellung des Trockenpräparates gelang es hin und wieder, bei bestimmter, ziemlich hoher Konzentration kleine Mengen von Krystallen durch mechanische Auslese zu gewinnen. Sie wurden durch mehrfaches Umkrystallisieren aus Wasser und wenig Alkohol unter Zusatz von Tierkohle gereinigt und krystallisierten aus diesem Lösungsmittel in Form schön ausgebildeter, nadelförmiger Prismen. Die Krystalle schmolzen nach dem Trocknen bei 308—309° (corr.) unter Zersetzung und zeigten einen sehr hohen Stickstoffgehalt. Zwei Stickstoffbestimmungen nach der Mikromethode von Dubsky ergaben:

I. 2,841 mg Substanz:	0,842 ccm N (24°; 714 mm) = 32,00 % N	} Berechnet für C ₄ H ₉ O ₂ N ₃ 32,06 % N.
II. 2,740 „ „	0,798 ccm N (19°; 717 mm) = 32,12 % N	

Der gefundene Stickstoffgehalt stimmt also fast genau mit dem für Kreatin berechneten überein und eine Mischprobe dieser Krystalle mit reinem Kreatin zeigte denn auch nicht die geringste Schmelzpunktsdepression, sodaß die Identität sichergestellt ist.

b) In Alkohol löslicher Teil des Fleischbrühepulvers. Im Gegensatz zu allen übrigen Präparaten bildete diese Fraktion nach dem Trocknen einen

sehr zähen, ungemein hygroskopischen Sirup, der, an die Luft gebracht, sofort Wasser anzog. Er wurde deshalb ständig über Phosphorpentoxyd aufbewahrt. Das genaue Abwägen und auch das sonstige Hantieren mit diesem Präparat waren wegen dieser unangenehmen Eigenschaften sehr erschwert und gelangen nur ganz selten einwandfrei.

Der Sirup reagierte auf Lackmus stark sauer, auf Kongo- und Tropäolinpapier dagegen neutral. Die saure Reaktion, wie auch der saure Geschmack rührte daher sehr wahrscheinlich von organischen Säuren, am ehesten von Milchsäure her. Die Xanthoprotein- und Biuretreaktion waren vollständig negativ. Mit Millon'schem Reagens erhielt man oft Andeutungen von positiver Reaktion, indem sich beim Erhitzen eine schwache Rosafärbung zeigte, die aber nachher in Gelb überging. Die qualitative Prüfung auf Stickstoff und Schwefel verlief positiv, diejenige auf Phosphor dagegen völlig negativ. Aus der Abwesenheit von Phosphor in dieser Fraktion geht hervor, daß die Fleischbrühe sehr wahrscheinlich auch kein Lecithin enthält, das bekanntlich in Alkohol leicht löslich ist und sich daher hauptsächlich im alkohollöslichen Teil hätte finden müssen.

Durch positive Jodoformreaktion und Gelbfärbung des Uffelmann'schen blauen Eisenchlorid-Phenolreagens wurde die Anwesenheit von Milchsäure erwiesen.

Bei der Konzentrierung der alkoholischen Extrakte wurden meistens kleine Krystallausscheidungen erhalten, die sich aus wechselnden Mengen von Kaliumchlorid, Kreatinin und Kreatin zusammensetzten. Über die quantitative Zusammensetzung der beim Hauptversuch gewonnenen Krystallfraktion vergl. Abschnitt 8, 17.

c) In Alkohol unlöslicher Teil des Fleischbrühepulvers. Das in absolutem Alkohol unlösliche Pulver löste sich spielend in Wasser. Die wässrige Lösung reagierte neutral gegen Lakmus, Kongo und Tropäolin. Die Prüfung auf Phosphor, Stickstoff und Schwefel verlief mit positivem Resultat. Sowohl die Biuret- als auch die Millon'sche Reaktion waren stark positiv.

Eine mit Schwefelsäure angesäuerte wässrige Lösung dieser Fraktion lieferte mit Phosphorwolframsäure dicke, weiße Fällungen, die hauptsächlich dem hohen Gehalt an Kalisalzen, aber auch anderen Verbindungen ihre Ursache verdanken. Ursprünglich war geplant, den alkoholunlöslichen Teil der Extraktivstoffe mit Hilfe dieses Fällungsmittels zu fraktionieren, um nach Entfernung der Phosphorwolframsäure kleinere Fraktionen zu erhalten, die dann getrennt auf Geschmacksträger hätten untersucht werden können. Es wurden mehrere Versuche in dieser Richtung unternommen, aber nicht zu Ende geführt, da inzwischen das Dialyseverfahren eine direkte Trennung dieser Fraktion in schmeckende und nichtschmeckende Körper ermöglichte.

Sowohl von dieser Fraktion, wie von der ursprünglichen festen Fleischbrühe waren ferner bei Vorversuchen quantitative Bestimmungen einiger Hauptbestandteile vorgenommen worden. Da sie indessen mehr informatorischen Charakter trugen, wegen der Knappheit des Materials auch nicht vervollständigt werden konnten und zudem beim Hauptversuch wiederholt wurden, so sei hier nicht näher darauf eingegangen, sondern auf den folgenden Abschnitt verwiesen.

d) Dialysate. Die durch Eindampfen ihrer wässrigen Lösung gewonnenen Dialysate erwiesen sich nach dem völligen Trocknen als schwach gefärbte, luftbeständige, amorphe Körper, die in Wasser spielend leicht löslich waren. Ihre Lösungen reagierten neutral, sie gaben weder die Biuret- noch die Millon'sche Reaktion. Da die Geschmacksprüfung ergeben hatte, daß nur die zuerst dialysierenden Anteile Fleischbrühegeschmack aufwiesen, wurden die später dialysierenden Fraktionen nicht näher untersucht.

Die im folgenden stets als „erstes Dialysat“ bezeichnete Fraktion wurde dagegen qualitativ und quantitativ genau untersucht. Zu diesem Zwecke wurde eine wässrige Lösung benutzt, deren quantitative Zusammensetzung im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Da die wässrige Lösung sehr leicht schimmelte, wurde sie mit Toluol überschichtet, von Zeit zu Zeit gut durchgeschüttelt und das verdunstende Toluol durch frisches ersetzt. Die qualitative Untersuchung ergab das Vorhandensein folgender Substanzen:

Sehr viel Phosphorsäure, wenig Salzsäure, wenig Kohlensäure; vielleicht Salpetersäure und Schwefelsäure.

Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure; vielleicht Bernsteinsäure und Buttersäure; verschiedene Aminosäuren.

Sehr viel Kalium, viel Calcium, wenig Natrium, wenig Magnesium und leicht Eisen.

Völlig abwesend sind: Peptone, Albumosen, Eiweißkörper, ferner Tyrosin und ähnliche Körper mit Phenolkern.

Eine quantitative Voruntersuchung ergab einen Gehalt der Trockensubstanz von nahezu 50% anorganischen und etwas über 50% organischen Stoffen. Im einzelnen wurden gefunden etwa 0,7% Kaliumchlorid, 46% Phosphat, 2,5% glutaminsaures Kalium, 1,75% Aminosäure-Stickstoff und 9,84% Gesamt-Stickstoff. Ferner waren anwesend etwas über 1% Kreatinin und etwa 3% Kreatin. Die Reaktionen auf Glykose fielen durchweg negativ aus, einzig Tollens'sche Silberlösung wurde reduziert, was auf die Anwesenheit von Inosit hinwies.

e) Nicht dialysierender Teil. Der nicht dialysierende Anteil des alkohol-unlöslichen Fleischbrühepulvers, der aus der im Pergamentbeutel befindlichen wässrigen Lösung durch Eindampfen im Vakuum isoliert wurde, hinterblieb als schwach gelblich bis bräunlich gefärbter lamellenartiger Rückstand. Er war völlig luftbeständig und löste sich in Wasser leicht, aber nicht ganz klar und mit ganz schwach saurer Reaktion wieder auf. Alle gebräuchlichen Reaktionen auf Eiweiß- und Peptonkörper fielen natürlich stark positiv aus, vor allem die Biuret- und Millon'sche Reaktion, ferner auch die Xanthoproteinreaktion, die Reaktion von Molisch, die Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd oder Vanillin mit konc. Schwefelsäure, die Schwefelblei-reaktion und die charakteristische Färbung mit Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin) von Abderhalden.

Die Substanz verbrannte vollkommen, ohne Hinterlassung einer Asche; sie gab keine Flammenfärbung und auch Chlor war völlig abwesend, da beim Versetzen der mit Salpetersäure angesäuerten Lösung mit Silbernitrat nicht die geringste Trübung erhalten wurde.

Die beim Hauptversuch im Pergamentbeutel zurückbleibende Lösung enthielt, da sie nicht vollständig bis zu Ende dialysiert war, natürlich auch noch niedrig molekulare, krystalloide Körper. Sie diente trotzdem als solche, unter Toluol aufbewahrt, zur Ausführung einer Anzahl quantitativer Bestimmungen (vergl. den folgenden Abschnitt).

8. Quantitative Analyse der Fleischbrühe und ihrer Fraktionen.

Aus 36,77 kg von Fett, Sehnen und Haut befreitem Rindfleisch waren 1394 g Fleischbrühe-Trockenpräparat gewonnen worden. Dieses Trockenpräparat war nie höheren Temperaturen als 40° ausgesetzt und es war schließlich im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet worden. Bei der Bestimmung der Trockensubstanz durch 2 1/2-stündiges Trocknen bei 105° zeigte sich, daß das Präparat, wie auch die

aus ihm gewonnenen Fraktionen noch wesentliche Gewichtsverluste erlitten, sodaß die soeben angegebene Ausbeute als zu hoch angesehen werden muß.

Nach den im folgenden niedergelegten Zahlen entsprechen den 1394 g vortrocknetem Fleischbrühepräparat 1218,3 g wirkliche Trockensubstanz, sodaß die Ausbeute an wirklich trockener Fleischbrühe 3,314 % des angewandten frischen Fleisches beträgt.

Von diesem roh getrockneten Fleischbrühepräparat (A) wurden etwa 450 g für Vorversuche verwendet, 60 g als Reserve aufgehoben und 885 g (entsprechend 773,5 g wirklicher Trockensubstanz) zum Hauptversuch, der im folgenden nochmals kurz resümiert wird, verwendet.

Bei dreimaliger Extraktion mit absolutem Alkohol bei 40° wurden erhalten 318,80 g alkohollöslicher Teil (B) neben 23,05 g Krystallen (B₁), die vorwiegend aus Kaliumchlorid und Kreatinin bestanden. Da der alkohollösliche Teil ungemein stark hygroskopisch war, gelang die Bestimmung der wirklichen Trockensubstanz nur schwer. Es konnte annähernd festgestellt werden, daß den 318,80 g 223,90 g wirkliche Trockensubstanz entsprachen.

Der in absolutem Alkohol unlösliche Teil (C) wog 601 g; aus der Trockensubstanzbestimmung ergab sich, daß auch diese Fraktion bei 105° noch an Gewicht verlor, sodaß die wirkliche Trockensubstanz mit 539,6 g in Rechnung zu setzen ist.

Der größte Teil des alkoholunlöslichen Teiles, nämlich 503 g, entsprechend 451,6 g Trockensubstanz, wurde der Dialyse unterworfen und dabei folgende Fraktionen erhalten:

142,56 g Erstes Dialysat (D).

17,20 g Krystalle (D₁), fast völlig anorganisch

9,12 g Rückstände (D₂) von der Dialysiermembran, Filtern usw.

zusammen: 168,88 g Erst-Dialysierendes.

Aus der Differenz gegen die angewandte Menge würde sich die Menge des „nicht Dialysierten“ zu 282,7 g (E) berechnen¹⁾.

Zur besseren Übersicht sei der ganze Verlauf nochmals schematisch dargestellt, wobei nur die Zahlen der wirklichen Trockensubstanz eingestellt sind:

Eine Reihe von Geschmacksproben ergab übereinstimmend, daß man auf dem hier eingeschlagenen Wege dazu gelangt, die Geschmacksstoffe der Fleischbrühe von den meisten Ballaststoffen zu befreien und in einer einzigen Fraktion (D) anzureichern. Alle übrigen Fraktionen zeigten nicht entfernt den Geschmack von Fleischbrühe. Einzig die Fraktion B (Alkohollöslicher Teil) zeigte einen ausgesprochen sauren Geschmack, der wohl eine Komponente des ursprünglichen Fleischbrühegeschmackes dar-

¹⁾ Die Bestimmung der Trockensubstanz ergab jedoch, daß nur 226,9 g wirkliche Trockensubstanz vorhanden sind.

stellt. Zur Isolierung der Geschmacksträger kam also hauptsächlich die Fraktion D (Erstes Dialysat) in Betracht und daneben die Fraktion B wegen ihres sauren Geschmackes.

Bei der Hauptuntersuchung wurde nicht nur die Fraktion D der genauen quantitativen Analyse unterzogen, sondern gleichzeitig wurden auch in allen übrigen Fraktionen A, B, C und E dieselben Bestimmungen ausgeführt. Dies hatte natürlich eine Grenze, wo es sich um ganz spezielle Bestimmungen handelte, die viel Zeit und Material erforderten, wie z. B. die Bestimmung der Aminosäuren, der Fleischblasen, der Purine, der Zucker- und der Aschenbestandteile, die bisher nur in der Fraktion D ausgeführt wurden. Alle übrigen relativ einfachen Bestimmungen: Gesamt-, Amino-, Diamino-, Reinprotein-, Ammoniak-Stickstoff, Chlor, Asche, flüchtige Säuren, Kreatin usw. wurden in allen Fraktionen gleichzeitig ausgeführt.

Aus den prozentualen Werten, die bei der Analyse der einzelnen Fraktionen erhalten wurden, ließ sich dann, ausgehend von der folgenden Überlegung, ein anschauliches Bild von der Zerlegung der Fleischbrühe in ihre einzelnen Bestandteile, vorab in die Geschmacksträger, gewinnen.

Man möchte z. B. wissen, wie viel von der ursprünglich in der festen Fleischbrühe vorhandenen Milchsäure in den alkohollöslichen Teil (B) einerseits und in den alkoholunlöslichen Teil (C) andererseits und von da noch in das erste Dialysat (D) gelangt. Diese Frage zu entscheiden, ist schon deshalb wichtig, weil man nach den bisherigen analytischen Methoden nur in besonders glücklichen Fällen imstande ist, zu entscheiden, welcher Anteil der Milchsäure in freiem und welcher in gebundenem Zustand vorkommt. Dieses aufzuklären wäre auch in Hinsicht auf den Fleischbrühegeschmack sehr erwünscht, da die freie Milchsäure natürlich stark sauer schmeckt, die Salze aber nicht. Milchsäures Calcium ist ganz geschmacklos.

In 100 g fester Fleischbrühe (A) seien a g Gesamt-Milchsäure (frei und gebunden) enthalten. Man extrahiert die feste Fleischbrühe mit absolutem Alkohol und kann mit ziemlicher Sicherheit darauf rechnen, daß die freie Milchsäure, wenn solche vorhanden ist, vollständig in die alkoholische Lösung hineingeht, von den milchsäuren Salzen jedenfalls nur ein kleiner Teil, da sie in Alkohol jedenfalls nicht so gut löslich sind. Man erhält aus 100 g fester Fleischbrühe 28,946 g alkohollöslichen Teil (B) mit einem Gehalt von b^1 % Milchsäure. Dann enthalten B g alkohollöslicher Teil $\frac{B \times b^1}{100} = b$ g Milchsäure, und zwar überwiegend im freien Zustand.

Neben dem alkohollöslichen Teil (B) erhält man aus 100 g fester Fleischbrühe 69,76 g alkoholunlöslichen Teil (C) mit einem Gehalt von c^1 % Milchsäure (vorwiegend gebunden). C g dieses alkoholunlöslichen Teils enthalten demnach $\frac{C \times c^1}{100} = c$ g Milchsäure.

Sind die Analysen richtig, so muß nun auch die Kontrolle stimmen. Wenn man aus 100 g fester Fleischbrühe (A) mit a g Milchsäuregehalt B g alkohollöslichen Teil mit b g Milchsäure und C g alkoholunlöslichen Teil mit c g Milchsäure erhält, so muß $b + c = a$ sein.

Die gleichen Überlegungen gelten auch für die Zerlegung des alkoholunlöslichen Teils in das erste Dialysat und den nicht dialysierten Teil.

C g alkoholunlöslicher Teil ergeben	D g erstes Dialysat und	E g Nichtdialysiertes
mit c g Milchsäure	mit d g Milchsäure	mit e g Milchsäure
$c = d + e$ oder $a = b + d + e$.		

Auf diese Weise erfährt man, in welchen Fraktionen sich die freie und die gebundene Milchsäure anreichert, ob sie wesentlich zum Geschmack der Fleischbrühe beiträgt und endlich ob die Milchsäurebestimmungsmethode richtige Resultate ergibt. Im Falle der Milchsäure spielen die 3 kleinen Unterfraktionen, die oben angeführt sind, keine Rolle, da sie milchsäurefrei sind. Bei der Kontrolle der Stickstoff-, Kreatinin-, Mineralstoff- und Chlorbestimmung werden sie aber in ähnlicher Weise in Rechnung gesetzt.

Hier ist wohl der Ort, sich über die bei allen Analysen unvermeidlichen Fehler Rechenschaft zu geben, da sie bei der Kontrolle am deutlichsten hervortreten. Bei den gewöhnlichen, alltäglich vorgenommenen Analysen beträgt die Fehlergrenze $\pm 0,3\%$. Bei den biochemischen Analysen bleiben die Fehler nur in den allerseisten Fällen (etwa bei der Kjeldahl-Bestimmung) innerhalb dieser Grenze, meist sind sie aber ganz bedeutend größer und erreichen nicht selten Werte von $\pm 5\%$ und mehr. Fallen nun bei einer Bestimmungsreihe alle Fehler in der gleichen Richtung aus, so werden sie natürlich bei der Kontrolle summiert und Differenzen bis 10% und mehr sind durchaus möglich. Hierzu kommt dann noch, daß auch die als maßgebend angenommenen Trockensubstanzbestimmungen nicht in allen Fällen mit genügender Genauigkeit vorgenommen werden konnten.

In dieser Hinsicht müssen besonders die Zahlen des alkohollöslichen Teils (B) mit Vorsicht gehandhabt werden. Diese Fraktion ließ sich wegen ihrer stark hygroskopischen Eigenschaften nur annähernd genau abwägen und da sie überdies den größten Teil der freien flüchtigen Bestandteile enthielt, so ergab jedenfalls auch die Bestimmung der Trockensubstanz bei 105° , wie sie aus Analogie zu den übrigen Fraktionen durchgeführt werden mußte, schon wesentliche Verluste, die nicht nur auf Rechnung des noch anhaftenden Wassers zu setzen sind.

Die bei der Ausrechnung der Kontrolle zugrunde gelegten Zahlen sind in dem folgenden Schema, das von 100 g fester Fleischbrühe ausgeht, zusammengestellt. Der Einfachheit halber sind für die einzelnen Fraktionen, deren Bezeichnung immer wiederkehrt, Buchstaben eingesetzt, die im folgenden immer wieder angewendet werden. Durch das Schema werden auch die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Fraktionen der festen Fleischbrühe zueinander stehen, klargestellt.

Analytischer Teil.

Von jeder einzelnen Fraktion wurden Sammellösungen durch möglichst genaues Einwiegen in Meßkolben und Auffüllen mit Wasser bis zur Marke hergestellt. Beim alkoholunlöslichen Teil C erwies es sich als nötig, die ursprünglich 10% -ige Lösung auf das Doppelte zu verdünnen, da diese Lösung bei etwa 20° gelatinierte. Um bakterielle Zersetzungen bei diesen leicht verderblichen Körpern zu vermeiden, wurden alle Lösungen unter Toluol aufbewahrt, wodurch allerdings die Möglichkeit von autolytischen

Zersetzungen nicht ausgeschaltet war. Dies mußte leider in Kauf genommen werden, da es anders nicht möglich war, stets genaue Durchschnittsproben zur Analyse zu bringen.

Von diesen Stammlösungen dienten aliquote Teile zur Ermittlung der einzelnen Bestandteile, und zwar wurden, wo immer möglich, die Bestimmungen stets mit ungefähr derselben Menge Trockensubstanz ausgeführt.

1. Herstellung der Stammlösungen und Bestimmung der Trockensubstanz.

Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurde eine etwa 1 g Trockensubstanz entsprechende Menge Stammlösung (meist 10 ccm) in eine tarierte Porzellanschale mit Quarzsand und Glasstab abgemessen, 2½ Stunden bei 105° getrocknet und wieder gewogen:

- 1605 A. Abgewogen 22,2386 g feste Fleischbrühe; aufgefüllt auf 200 ccm. In 10 ccm Stammlösung 0,9718 und 0,9718 g, im Mittel 0,9718 g Trockensubstanz.
- 1605 B. Abgewogen etwa 21,42 g alkohollöslicher Teil; aufgefüllt auf 250 g (ohne Krystalle). In 10 ccm Stammlösung 0,7522 g Trockensubstanz.
- 1605 C. Abgewogen 20,5031 g alkoholunlöslicher Teil; aufgefüllt auf 200 ccm, 100 ccm dieser Lösung verdünnt auf 200 ccm. In 10 ccm der 2. Stammlösung 0,4611 g Trockensubstanz.
- 1605 D. Das gesamte erste Dialysat, ohne die krystallinischen Ausscheidungen und Filterrückstände, wird nach dem Konzentrieren auf 1000 ccm gebracht. In 10 ccm Stammlösung 1,4324 g und 1,4189 g, im Mittel 1,4256 g Trockensubstanz.
- 1605 E. Die letzte, nicht dialysierte Fraktion der festen Fleischbrühe, deren Menge 5320 ccm (+ 22,85 g Rückstände von Filtern usw.) betrug, wurde in einer großen Standflasche unter Toluol aufbewahrt und direkt zu den Bestimmungen verwendet. In 10 ccm Stammlösung 0,3835 g Trockensubstanz.

2. Bestimmung der Reinasche (Mineralstoffe).

Die Reinasche wurde nach der Vorschrift von König (Nahrungsmittelchemie 3, I, 476) bestimmt. Aliquote Teile der Stammlösungen wurden in einer Platinschale zur Trockne gebracht, verascht, der Rückstand wurde mit Wasser ausgezogen, filtriert und der Filterrückstand (Kohle) samt Filter verbrannt und leicht geglüht. In der wässrigen Lösung der Reinasche wurde nachher das Chlor bestimmt.

- 1605 A. In 10 ccm Stammlösung 0,2309 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 23,760 g Reinasche.
- 1605 B. In 10 ccm Stammlösung 0,1565 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 20,806 g Reinasche.
- 1605 B₁. In 23,05 g krystallinischer Ausscheidung 11,83 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 51,320 g Reinasche.
- 1605 C. In 10 ccm Stammlösung 0,2304 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 24,983 g Reinasche.
- 1605 D. In 10 ccm Stammlösung 0,6740 u. 0,6743 g Reinasche (2 Bestimmungen).
In 100 g Trockensubstanz 47,292 g Reinasche.
- 1605 D₁. In 0,6824 g krystallinischer Ausscheidung 0,6158 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 90,240 g Reinasche.
- 1605 D₂. In 9,12 g Filterrückstand 4,3130 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 47,292 g Reinasche.
- 1605 E. In 30 ccm Stammlösung 0,0614 g Reinasche.
In 100 g Trockensubstanz 5,645 g Reinasche.

3. Bestimmung des Chlors in der Reinasche.

Die Lösung der gesamten, bei der vorhergehenden Bestimmung gewonnenen Reinasche wurde mit Salpetersäure schwach angesäuert und das Chlor als Chlorsilber gefällt und zur Wägung gebracht.

Tabelle 1.

1	2	3	4	5	6	7
Versuchs-Nr.	Zahl der Bestimmungen	In 10 ccm Stammlösung Chlor g	In 100 g Trockensubstanz		In 100 g Reinasche	
			Chlor %	Kaliumchlorid %	Chlor %	Kaliumchlorid %
1605 A	2	0,011688	1,203	2,529	5,062	10,645
1605 B	1	0,001979	0,263	0,553	1,265	2,660
1605 B ₁	2	In 23,05 g Krystallen 5,5103	23,906	50,262	37,898	79,686
1605 C	1	In 10 ccm Stammlösung 0,004799	0,520	1,904	2,083	4,380
1605 D	2	0,032050	2,248	4,726	4,753	9,994
1605 D ₁	1	0	—	—	—	—
1605 D ₂	—	—	2,248	4,726	4,753	9,994
1605 E	2	0	—	—	—	—

Tabelle 2.

Zusammenstellung und Kontrolle. Bestimmung der Trockensubstanz, der Reinasche, des Chlors.

1	2	3	4	5	6	7	8
Versuchs-Nr.	In 100 g fester Fleischbrühe sind enthalten Trockensubstanz x g	Reinasche		Chlor		Kaliumchlorid	
		in 100 g	in x g	in 100 g	in x g	in 100 g	in x g
1605 A	100,000	23,760	23,760	1,203	1,203	2,530	2,530
1605 B	28,946	20,806	6,013	0,263	0,076	0,553	0,160
1605 B ₁	2,980	51,320	1,529	23,906	0,712	50,262	1,497
1605 C	69,760	24,983	17,464	0,502	0,364	1,094	0,765
B + B ₁ + C	101,686	—	25,006	—	1,152	—	2,422
Differenz { g gegen A { %	+1,686 +1,686	— —	+1,246 +5,24	— —	-0,051 -4,24	— —	-0,108 -4,24
1605 D	22,020	47,292	10,415	2,248	0,495	4,726	1,041
1605 D ₁	2,657	90,240	2,398	0	0	0	0
1605 D ₂	1,409	47,292	0,666	2,248	0,032	4,726	0,066
1605 E	34,980	5,645	1,975	0	0	0	0
B + B ₁ + D + D ₁ + D ₂ + E	92,992	—	22,996	—	1,315	—	2,764
Differenz { g gegen A { %	-7,008 -7,008	— —	-0,764 -3,22	— —	+0,112 +9,31	— —	+0,234 +9,31

Gewöhnlich wird das in Fleischextrakten und ähnlichen Produkten enthaltene Chlor auf Chlornatrium umgerechnet, was in Anbetracht des überwiegenden Kaliumgehaltes dieser Präparate als etwas gezwungen erscheint. Auch die Umrechnung auf Kaliumchlorid, wie sie hier vorgenommen wird, ist nicht ganz einwandfrei, da sich wohl alle vorhandenen Metalle, je nach der Menge, in der sie anwesend sind, an der Salzbildung beteiligen. Diese Berechnung als Kaliumchlorid dürfte aber der Wirklichkeit am nächsten kommen.

4. Bestimmung des Gesamt-Stickstoffes.

Der Gesamt-Stickstoff wurde nach der Methode von Kjeldahl bestimmt, und zwar wurden in der Regel 10 ccm Stammlösung zur Analyse gebracht. Zur Oxydation diente eine Menge von 3 g Kaliumsulfat, 0,5 g Kupfersulfat und 10 ccm konc. Schwefelsäure, dem nach einiger Zeit eine kleine Spatelspitze Braunstein zugefügt wurde. Zur Übertreibung des Ammoniaks wurde die saure Lösung mit 180 ccm 25 0/0-iger Natronlauge stark alkalisch gemacht und etwa 200 ccm abdestilliert. Die Resultate samt Kontrollen sind in der folgenden Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.
Zusammenstellung und Kontrolle der gefundenen Werte für Gesamt-Stickstoff.

1	2	3	4	5	6
Versuchs Nr. 1606	Zahl der Bestimmungen	In 10 ccm Stammlösung mg	In 100 g Trockensubstanz %	In x g Trockensubstanz g	x
A	2	117,23	12,063	12,063	100,00
B	1	70,59	9,384	2,712	28,946
B ₁	1	173,88 ¹⁾	17,322	0,516	2,980
C	3	55,33	12,006	8,376	69,760
B+B ₁ +C	—	—	—	11,604	—
Differenz { g gegen A { %	— —	— —	— —	—0,459 —3,81	— —
D	2	149,42	10,480	2,308	22,020
D ₁	1	40,161 ²⁾	3,920	0,104	2,657
D ₂	1	95,480 ³⁾	9,007	0,127	1,409
E	1	57,58	15,014	5,252	34,980
B+B ₁ +B ₂ +D +D ₁ +D ₂ +E	—	—	—	11,019	—
Differenz { g gegen A { %	— —	— —	— —	—1,004 —8,66	— —

5. Bestimmung der flüchtigen Säuren (Ameisensäure, Essigsäure).

6. Bestimmung der Milchsäure.

Da bei beiden Analysen die Substanz in saurer Lösung mit Wasserdampf destilliert werden muß, so wurden zur Bestimmung der flüchtigen Säuren, wie auch

¹⁾ In 1,0009 g Substanz. ²⁾ In 1,0245 g Substanz. ³⁾ In 1,0620 g Substanz.

der Milchsäure, die gleichen Proben verwendet. Da es sich, wie bei der Ameisensäure, meist um die Bestimmung sehr kleiner Mengen handelte, so wurde zu jeder einzelnen Bestimmung möglichst viel Substanz verwandt, d. h. soviel, als sich mit der vorhandenen Menge vereinbaren ließ.

Um die angewandte Methodik zu erläutern, sei hier die Untersuchung des alkohollöslichen Teiles (B) auf flüchtige Säuren und auf Milchsäure ausführlich geschildert. Dabei wird sich Gelegenheit finden, einige kritische Bemerkungen über die Genauigkeit der Resultate anzuschließen.

30 ccm Stammlösung B (entsprechend 2,2566 g Trockensubstanz) wurden mit 50 ccm Wasser und mit 20 ccm Schwefelsäure (100 g konc. Schwefelsäure + 100 g Wasser) versetzt, sodaß das Gesamt-Volumen etwa 100 ccm betrug, worauf auch bei den übrigen Bestimmungen geachtet wurde, um gleiche Verhältnisse für die Wasserdampfdestillation zu schaffen. Nun wurde ein kräftiger Wasserdampfstrahl durchgeblasen und das Destillat so lange aufgefangen, als es noch sauer reagierte. Bei der Destillation ist darauf zu achten, daß sich das Volumen der Flüssigkeit nicht allzustark verändert. Wenn ungefähr 1000—1200 ccm Wasser abdestilliert sind, fängt das Destillat an, neutral zu reagieren; zur Sicherheit wurden stets 1500 ccm Destillat aufgefangen, und in aliquoten Teilen wurde die Gesamtmenge der flüchtigen Säuren durch Titration, die Ameisensäure nach der Sublimatmethode und die Essigsäure nach der Oxydation mit Kaliumbichromat-Schwefelsäure und erneuter Wasserdampfdestillation durch Titration bestimmt. Die Milchsäure wurde im Kolbenrückstand nach der Methode von Szeberényi bestimmt.

500 ccm des ersten Wasserdampfdestillates (entsprechend 10 ccm Stammlösung) verbrauchten zur Neutralisation 1,02 ccm $\frac{1}{2}$ N.-Natronlauge (Titration in der Hitze, Phenolphthalein als Indikator).

Mit dieser Zahl ließ sich von vornherein nicht viel anfangen, sie gab nur ein Bild von der Menge der anwesenden flüchtigen Säuren, nicht aber von deren Charakter. Dafür war sie aber bei der Kontrolle der Einzelbestimmungen der flüchtigen Säuren von Nutzen, da die Menge der flüchtigen Säuren (Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure) ihrem Äquivalentgewicht nach der Menge der bei der Titration verbrauchten Lauge entsprechen mußten.

Es soll gleich bemerkt werden, dass es sich hier um nicht gerade zuverlässige Werte handelt. Die Ameisensäure ist in so kleinen Mengen vorhanden, daß man, um ganz genaue Werte zu erhalten, 10-mal so große Mengen hätte anwenden müssen, was aber die Beschränktheit des Ausgangsmaterials nicht gestattete. Die Essigsäure wird erst nach zweimaliger Wasserdampfdestillation und dazwischenliegender Oxydation bestimmt, also nach einer Methode, die nur schwer quantitativ zu gestalten ist. Außerdem ist es möglich, daß auch Buttersäure vorhanden ist. Die Bestimmung der Buttersäure neben der Essigsäure ist sehr ungenau, es wurde darauf von Anfang an verzichtet, weil man auch hier nur bei Verarbeitung größerer Mengen auf befriedigende Ergebnisse rechnen kann.

Im allgemeinen wurde das Hauptgewicht auf genaue Untersuchung der beiden wichtigsten Fraktionen B (Alkohollöslicher Teil) und D (Erstes Dialysat) gelegt (je 3 übereinstimmende Analysen), während die übrigen Fraktionen mehr nebenbei auf flüchtige Säuren und Milchsäure untersucht wurden.

Nachdem die Menge der flüchtigen Säuren des ersten Destillats durch Titration mit Natronlauge in einem aliquoten Teil festgestellt war, wurde das ganze Destillat

mit der entsprechenden Menge Natronlauge neutralisiert, in 2 gleiche Teile geteilt und getrennt auf dem Wasserbad auf je etwa 50 ccm eingedampft.

Tabelle 4.

Durch Titration festgestellte Gesamtmenge der flüchtigen Säuren.
Vergleich mit den durch Einzelbestimmung gefundenen Mengen Ameisensäure und Essigsäure.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Versuch Nr. 1608	Zahl der Bestimmungen	Zur Ab-sättigung der flüchtigen Säuren aus 10 ccm Stammlösung sind erforderlich ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	Gefundene Menge Ameisensäure in 10 ccm Stammlösung mg	Gefundene Menge Essigsäure in 10 ccm Stammlösung mg	Die gefundene Menge Ameisensäure erfordert zur Neutralisation ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	Die gefundene Menge Essigsäure erfordert zur Neutralisation ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	Summe von Spalten 6 + 7	Differenz (Fehler) von Spalte 6 + 7 gegen Spalte 3	
		ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	mg	mg	ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	ccm $\frac{n}{2}$ NaOH	in ‰
A	1	1,40	1,726	23,982	0,08	0,80	0,88	-0,52	-37
B	3	1,02	0,673	33,466	0,03	1,11	1,14	+0,12	+11
C	1	0,81	0,429	14,167	0,02	0,47	0,49	-0,35	-42
D	3	6,23	10,538	179,49	0,46	5,98	6,44	+0,21	+ 3
E	1	0,49	0,743	11,816	0,03	0,39	0,42	-0,07	-14

Tabelle 5.

Zusammenstellung und Kontrolle der auf Trockensubstanz berechneten Werte von Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Versuch Nr. 1608	Zahl der Bestimmungen	Ameisensäure		Essigsäure		Milchsäure			
		In 100 g	In x g	In 100 g	In x g	In 10 ccm Stammlösung g	In 100 g	In x g	x
		%	g	%	g		%	g	
A	1	0,1776	0,1776	2,458	2,458	0,2559	27,148	27,148	100,00
B	3	0,0894	0,0258	4,449	1,286	0,3903	51,898	14,996	28,946
C	1	0,0930	0,0649	3,072	2,143	0,0840	18,774	13,097	69,760
B+C	—	—	0,0907	—	3,429	—	—	28,093	—
Differenz gegen A	g	—	—	0,0869	—	+0,971	—	+0,845	—
	%	—	—	48,93	—	+39,51	—	+3,24	—
D	3	0,7390	0,1591	12,591	2,774	0,0970	6,806	1,499	22,020
E	2	0,1940	0,0678	3,081	1,078	0,0532	14,295	5,000	34,980
B+D+E	—	—	0,2527	—	5,138	—	—	21,495	—
Differenz gegen A	g	—	—	+0,0751	—	+2,680	—	-5,653	—
	%	—	—	+42,29	—	+109,03	—	-20,82	—

a) Bestimmung der Ameisensäure: Die auf 50 ccm eingedampfte, neutrale Lösung wurde direkt zur Bestimmung verwendet. Zu diesem Zwecke wurde sie in einen 300 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben gespült und mit 3 g Natriumacetat,

2 g Kochsalz, 12 ccm Sublimatlösung und mit 20 Tropfen Salzsäure (Spez. Gew. 1,125) versetzt, 2 Stunden ins siedende Wasserbad eingehängt. Nach dieser Zeit wurden 10 ccm Salzsäure (Spez. Gew. 1,125) hinzugegeben, noch $\frac{1}{2}$ Stunde auf die heiße Wasserbadplatte gestellt, durch den Gooch-Tiegel filtriert, getrocknet und das abgeschiedene Quecksilberchlorür zur Wägung gebracht.

So wurden in der einen Hälfte des Destillats (entsprechend 15 ccm Stammlösung) 0,0094 g gefunden. Dies entspricht für 10 ccm Stammlösung oder für 0,7522 g Trockensubstanz 0,000611 g Ameisensäure (entsprechend 0,03 ccm n NaOH).

In 100 g Trockensubstanz 0,08123 g Ameisensäure.

In 28,946 g (B) Trockensubstanz . 0,0253 g „

b) Bestimmung der Essigsäure: Die auf 50 ccm eingedampfte zweite Hälfte des ersten Wasserdampfdestillats wurde, nach der Vorschrift von König (3. I. 460) mit 50 ccm Oxydationslösung (90 g Kaliumbichromat + 400 g konc. Schwefelsäure im Liter) versetzt und 10 Minuten am Rückflußkühler erhitzt. Dabei soll die Ameisensäure zerstört werden, und die angeblich unveränderte Essigsäure und Buttersäure wird nun durch erneute Wasserdampfdestillation aus der Lösung abgeblasen. Auch hier fängt man das Destillat auf, bis es nicht mehr sauer reagiert, was schon sehr bald der Fall ist (1000 ccm). Durch Titration mit $\frac{1}{10}$ N.-Barytlauge (Phenolphthalein als Indikator) wurde die übergegangene Säure ermittelt und der Einfachheit halber auf Essigsäure berechnet:

1000 ccm Destillat (entsprechend 15 ccm Stammlösung) verbrauchten 8,39 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Barytlauge. Dieses entspricht:

In 10 ccm Stammlösung oder in 0,7522 g Trockensubstanz 0,03358 g Essigsäure (entsprechend 1,11 ccm $\frac{1}{2}$ N.-Natronlauge).

In 100 g Trockensubstanz 4,465 g Essigsäure

In 28,946 g (B) Trockensubstanz . 1,290 g „

Kontrolle: Die Menge der bei der Titration der gesamten flüchtigen Säuren verbrauchten Natronlauge betrug (s. o.) 1,02 ccm; die gefundene Menge Ameisensäure entsprach 0,03 ccm, die gefundene Menge Essigsäure 1,11 ccm, zusammen 1,14 ccm Natronlauge statt 1,02 ccm. Der Fehler von rund + 11% muß auf die Ungenauigkeit der Bestimmungsmethoden zurückgeführt werden.

c) Bestimmung der Milchsäure: Der Kolbenrückstand von der ersten Wasserdampfdestillation enthielt 20 ccm konc. Schwefelsäure (100 g Schwefelsäure + 100 g Wasser); er enthielt keine flüchtigen Säuren mehr und konnte direkt zur Bestimmung der Milchsäure verwendet werden. Hierzu wurde die vor kurzem bekannt gewordene Methode von P. Szeberényi¹, benutzt. Es wurden noch 20 ccm Chromsäurelösung (50 g Chromtrioxyd + 100 g Wasser) hinzugegeben und 15 Minuten am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Dabei wurde die Milchsäure größtenteils zu Essigsäure oxydiert, ein kleiner Teil (nach Szeberényi 3%) wurde völlig zerstört. Dieser Fehlbetrag wurde durch einen Aufschlag von 3% auf die gefundenen Werte kompensiert. Aus der oxydierten Lösung wurde nun die entstandene Essigsäure mit Wasserdampf abdestilliert. Hier dauerte es ziemlich lange, bis das Destillat neutral reagierte; meist kam man aber mit dem Auffangen von 2500 ccm Destillat aus. Die Essigsäure wurde in einem aliquoten Teil des Destillats durch Titration mit Natronlauge in der Siedehitze (Phenolphthalein als Indikator) bestimmt und als äquivalente Milchsäure berechnet.

¹) Zeitschr. analyt. Chem. 1917, 56, 505.

500 ccm Destillat (aus 6 ccm Stammlösung) verbrauchten 5,23 ccm $\frac{1}{2}$ N.-Natronlauge; diesen entsprechen für 10 ccm Stammlösung oder 0,7522 g Trockensubstanz 0,3924 g Milchsäure. Hierzu kommt nun der Aufschlag von 3%, und die korrigierten Werte sind dann:

In 10 ccm Stammlösung oder in 0,7522 g Trockensubstanz	0,4042 g Milchsäure
„ 100 g Trockensubstanz	53,736 g „
„ 28,496 g (B) Trockensubstanz	15,530 g „

Zwei weitere, analog ausgeführte Bestimmungen ergaben fast übereinstimmende Werte. Die Mittelwerte aller Bestimmungen der flüchtigen Säuren und der Milchsäure und ihre Kontrolle finden sich in den Tabellen 4 und 5 (S. 316).

Aus der Kontrolle sind ziemlich große Differenzen ersichtlich. Teilweise rühren sie von der schon erwähnten, nicht gerade großen Genauigkeit in der Bestimmung der flüchtigen Säuren her. Auffallend ist aber der große Fehlbetrag von 20% Milchsäure, den die beiden letzten Fraktionen D und E gegenüber der ursprünglichen festen Fleischbrühe aufweisen. Die Erklärung dafür ist indessen naheliegend. Die ersten drei Fraktionen, feste Fleischbrühe, alkohollöslicher und alkoholunlöslicher Teil wurden in fester Form aufbewahrt und Stammlösungen daraus nur nach Bedarf hergestellt. Die beiden letzten Fraktionen, D und E wurden dagegen in ihrer Gesamtheit als 15%-ige bzw. 4%-ige Lösungen aufbewahrt. Sie waren zwar durch reichlichen Toluolzusatz vor Zersetzungen durch Mikroorganismen geschützt, doch war durch das Toluol eine Autolyse im Sinne des Abbaus der reichlich vorhandenen Milchsäure zu niedrigeren Fettsäuren nicht ausgeschlossen. Und daß dieser Abbau wirklich eintrat, dafür sprechen die großen Überschüsse dieser beiden Fraktionen an Essigsäure und Ameisensäure, die nicht allein durch Analysenfehler erklärt werden können. Die Tatsache einer autolytischen Veränderung der beiden in Lösung aufbewahrten Fraktionen scheint sich auch aus den Ammoniakbestimmungen (s. d.) zu ergeben.

7. Bestimmung des Ammoniaks.

Der Ammoniakgehalt läßt sich nach einer ganzen Reihe von Methoden ermitteln; es ist aber schwer, die für den speziellen Fall am besten passende herauszufinden. Die Hauptschwierigkeit besteht darin, daß aus so überaus empfindlichen Substanzen, wie sie hier zur Untersuchung standen, durch chemische Agenzien nicht nur das präformierte Ammoniak ausgetrieben wird, sondern daß auch sekundär, z. B. durch Abspaltung aus Aminogruppen, Ammoniak gebildet werden kann, das dann gleichzeitig mit dem präformierten mitbestimmt wird. Nun herrscht aber gerade über die Wahl des zur möglichst schonenden Ammoniak Austreibung zu verwendenden Alkalis und auch über die Art der Destillation (Vakuum oder gewöhnlicher Druck) bei den einzelnen Autoren große Meinungsverschiedenheit. Es erschien daher als das beste, sich nicht auf eine einzelne Methode festzulegen, sondern zwei verschiedene Methoden zur Anwendung zu bringen und die gefundenen Werte erst dann als richtig anzusehen, wenn sie nach beiden Methoden mit annähernder Übereinstimmung erhalten wurden. Bei den wichtigeren Fraktionen A, B und D wurden beide Methoden benutzt.

I. Methode: Destillation mit Magnesia unter gewöhnlichem Druck: In einem kupfernen Erlenmeyer-Kolben befand sich eine Aufschwemmung von 18–20 g Magnesia in 250 ccm Wasser. Der Kolben trug, wie bei der Kjeldahl-Destillation, zur Verhütung des Überspitzens einen Aufsatz, der mit einem Liebig'schen Kühler verbunden war. Der Kühler tauchte am anderen Ende in eine Vorlage ein, in der sich eine gemessene Menge halbnormaler Schwefelsäure befand. Weiter trug der Kupferkolben ein Trichterrohr mit Hahn, durch das,

wenn alle Verbindungen hergestellt waren, die zu untersuchende Lösung in die Magnesia-suspension eingespült wurde. Nun destillierte man unter gewöhnlichem Druck, bis alles Ammoniak übergetrieben war und titrierte die unverbrauchte Säure mit halbnormaler Natronlauge unter Verwendung von Methylorange als Indikator zurück.

II. Methode: Destillation mit Soda unter vermindertem Druck: Ein etwa 700 ccm fassender Rundkolben wurde mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine der drei Bohrungen ging eine Kapillare, durch die zweite ein Destillationsaufsatz und durch die dritte ein Tropftrichter. Der Destillationsaufsatz war mit einem Kühler verbunden, der am anderen Ende mit einem Vorstoß in eine Saugflasche mündete. In der Saugflasche befand sich eine gemessene Menge $\frac{1}{2}$ N.-Schwefelsäure. Um Verluste durch Mitreißen von Flüssigkeit zu vermeiden, wurde noch eine zweite Saugflasche mit wenig destilliertem Wasser angeschlossen, die nun mit der Vakuumpumpe in Verbindung stand. Nach Herstellung aller Verbindungen wurde durch den Tropftrichter zuerst die zu untersuchende Lösung in den Rundkolben gegeben, dann eine Lösung von 1–2 g Soda und einige Gramm Kochsalz in etwa 50 ccm Wasser. Nun wurde evakuiert und im Wasserbade langsam angewärmt, bis zu einer Badtemperatur von höchstens 50°. Bei einem Druck von 14–16 mm Quecksilber destillierte die Flüssigkeit langsam ab, wobei alles Ammoniak mitging. Nachdem man etwa $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ Stunden destilliert hatte, war die Übertreibung beendet; durch das Trichterrohr wurde Luft eintreten gelassen und nach quantitativer Vereinigung des Inhalts beider Saugflaschen die unverbrauchte Säure mit Natronlauge zurücktitriert.

Die gefundenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt, und zwar wurden die Mittelwerte der nach beiden Methoden gewonnenen Zahlen dem Mittelwert aus allen Analysen einer Fraktion gegenübergestellt. Die zutage tretenden Differenzen zwischen den beiden Bestimmungsverfahren sind wirklich bedeutungslos, sodaß die angeführten Werte einigen Anspruch auf Genauigkeit erheben können.

Tabelle 6.
Zusammenstellung der gefundenen Ammoniakwerte.
Berechnung auf Trockensubstanz und Gesamt-Stickstoff.

1	2	3	4	5	6	7
Versuch Nr. 1607	Zahl der Bestim- mungen	Methode	In 10 ccm Stammlösung mg NH ₃	In 100 g Trockensubstanz NH ₃ %	NH ₃ -Stick- stoff %	Von 100 g Gesamt- Stickstoff sind Ammoniak- Stickstoff %
A	2	I	13,710	1,411	1,161	9,62
	3	II	14,178	1,459	1,200	9,95
	Mittel		14,022	1,443	1,187	9,84
B	1	I	8,174	1,087	0,894	9,53
	3		7,727	1,028	0,845	9,01
	Mittel		7,876	1,047	0,861	9,18
B ₁	2	I	0	0	0	0
C	2	II	0	0	0	0
D	2	I	32,740	2,286	1,889	18,03
	1	II	32,868	2,306	1,897	18,10
	Mittel		32,783	2,299	1,892	18,05
E	2	I	2,938	0,766	0,623	4,15

Bei dieser Zusammenstellung fällt die völlige Abwesenheit von Ammoniak im alkoholunlöslichen Teil gegenüber der großen Menge Ammoniak auf, die sich in den daraus sich ableitenden weiteren Fraktionen D und E vorfindet. Angesichts der

recht guten Genauigkeit der Ammoniakbestimmungen muß auch dieses merkwürdige Ergebnis auf autolytische Prozesse zurückgeführt werden. Hier kommen wohl vor allem die Aminosäuren und Eiweißkörper in Frage, die ihre Aminogruppen auch ohne Einwirkung von Bakterien in Form von Aminogruppen abspalten können.

8. Bestimmung des Gesamt-Phosphors.

Hier konnte die vorbildlich ausgearbeitete Methode von A. Neumann¹⁾ benutzt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden auf nassem Wege mit dem Neumann'schen Säuregemisch (gleiche Teile konc. Schwefel- und Salpetersäure) durch etwa einstündiges gelindes Sieden verbrannt, und in der entstandenen Lösung wurde der gesamte Phosphor durch Ammoniummolybdat gefällt. Der Niederschlag wurde gut ausgewaschen, nach Zufügen von gemessenen Mengen $\frac{1}{2}$ N.-Natronlauge das Ammoniak vertrieben und die unverbrauchte Lauge mit $\frac{1}{2}$ N.-Schwefelsäure zurücktitriert. Es ergaben sich die folgenden Werte:

Tabelle 7.
Zusammenstellung und Kontrolle der gefundenen Werte von
Gesamt-Phosphor.

1	2	3	4	5	6
Versuch Nr. 1610	Zahl der Bestim- mungen	In 10 ccm Stamm- lösung mg	In 100 g Trocken- substanz %	In x g Trocken- substanz g	x
A	5	37,616	3,870	3,870	100,0
B	2	0	0	0	28,946
B ₁	0	—	0	0	2,980
C	2	26,194	5,681	3,964	69,760
B+B ₁ +C	—	—	—	3,964	—
Differenz { g gegen A { %	— —	— —	— —	+0,094 +2,43	— —
D	4	142,930	10,026	2,208	22,020
D ₁	geschätzt ²⁾	—	16,255	0,432	2,657
D ₂	berechnet	—	10,026	0,141	1,409
E	2	11,030	2,876	1,006	34,980
D+D ₁ +D ₂ +E	—	—	—	3,787	—
Differenz { g gegen A { %	— —	— —	— —	—0,083 —4,37	— —

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1902, 37, 115, 129; 1904, 43, 32, 35 usw.

²⁾ Der Gesamt-Phosphorwert der Krystallfraktion D₁ mußte durch Schätzung gewonnen werden. Diese Fraktion, die beim Eindampfen der Dialysatlösungen gewonnen worden war, erwies sich nach der qualitativen Prüfung als ein Gemenge von Kreatin, Kreatinin und Phosphaten, letztere sehr wahrscheinlich an Calcium gebunden. Durch einen unglücklichen Zufall ging leider, nach der quantitativen Bestimmung der Reinasche und des Gesamt-Stickstoffs, die ganze übrige Menge dieser Fraktion verloren, sodaß weder Kreatine noch Phosphate genau

9. Bestimmung des anorganisch gebundenen Phosphors.

Aus der Bestimmung des Gesamt-Stickstoffes auf die Art und Menge der einzelnen stickstoffhaltigen Komponenten einen Rückschluß zu ziehen, ist ebenso unmöglich, wie aus der Bestimmung des Gesamt-Phosphors Anhaltspunkte für die Bindungsarten des Phosphors zu gewinnen. Man hat zu unterscheiden zwischen anorganisch und organisch gebundenem Phosphor und bei beiden Kategorien noch zwischen löslichen und unlöslichen Phosphorverbindungen, sodaß sich also der Wert: Gesamt-Phosphor im allgemeinen aus 4 Einzelwerten zusammensetzt.

Im vorliegenden Fall sind die Verhältnisse insofern vereinfacht, als man es in der Fleischbrühe nur mit löslichen Phosphorverbindungen zu tun hat und deshalb auf die unlöslichen, die sich im ausgekochten Fleisch befinden, keine Rücksicht zu nehmen braucht. Bestimmt man die Menge des anorganisch gebundenen Phosphors und kennt man den Wert des Gesamt-Phosphors, so kann man aus der Differenz dieser beiden Werte auch die Menge des organisch gebundenen Phosphors erhalten.

Der anorganisch gebundene Phosphor ist wohl zur Hauptsache in Form von Phosphaten zugegen. Der organisch gebundene Phosphor kann in verschiedener Form vorkommen; es sei an die phosphorhaltigen Lecithine und ähnliche Verbindungen (Jekorin) erinnert, die man unter dem Namen Phosphatide zusammenfaßt; ferner an die Phosphor-Fleischsäure, die Inosinsäure usw.

Die Bestimmung des anorganischen Phosphors nach der von A. D. Emmett und H. S. Grindley¹⁾ modifizierten Methode von Hart-Andrews, die sich im weitern auch der Methode von Woy²⁾ anschließt, führte ich bis zur zweimaligen Fällung des Ammoniumphosphormolybdat-Niederschlags aus. Von da an folgte ich der Methode von Neumann, die im vorhergehenden Abschnitt erwähnt ist.

Die Bestimmungsmethode des anorganisch gebundenen Phosphors in dem Fleischbrühegemisch, die von den amerikanischen Forschern in schönen Arbeiten über das Fleisch und seine Extrakte ausgearbeitet wurde, verläuft nur unter peinlich genauer Befolgung der Vorschriften so, daß übereinstimmende Resultate erhalten werden. Im allgemeinen können selbst die Amerikaner nicht für absolute Genauigkeit garantieren, da viel auf die Menge und Art der anwesenden, störend wirkenden Beimengungen, namentlich der Eiweißkörper ankommt.

In der Tat zeigten sich bei den zum Teil stark eiweißhaltigen Fraktionen anfänglich erhebliche Schwierigkeiten, und es erwiesen sich mehrfache Bestimmungen nötig, um sichere Werte zu erhalten. Aus Materialmangel wurde die Bestimmung bei der ersten Fraktion nicht ausgeführt und ihr anorganischer Phosphorgehalt nur geschätzt, und zwar wurde der Mittelwert von C und von $D + D_1 + D_2 + E$ als der wahr-

bestimmt werden konnten. Die Kreatine wurden aus dem Stickstoffgehalt als Gesamt-Kreatinin berechnet (s. Tab. 12), für den Gehalt an Phosphor lag in der Reinaschenbestimmung wenigstens eine Angabe vor. Diese ergab einen Gehalt von 90,240 % Reinasche (s. Tab. 2). Nimmt man an, daß die anorganischen Bestandteile nur aus Calciumphosphat ($\text{CaHPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) bestanden, so berechnet sich aus dem Reinaschengehalt eine Menge von 16,255 % anorganischen (oder Gesamt-) Phosphors in 100 g Trockensubstanz dieser Krystallfraktion. Die Einsetzung und Verwertung dieser Zahl in dieser und den beiden folgenden Tabellen ergibt sich dann ohne weiteres.

¹⁾ Journ. Amer. Chem. Soc. 1906, 28, 25.

²⁾ Treadwell, Quantitative Analyse. VII. Aufl. 1917, 372.

scheinlichste eingesetzt. Da indessen die übrigen Bestimmungen Anspruch auf Genauigkeit erheben können, so dürfte auch der durch Schätzung gewonnene Phosphorwert der festen Fleischbrühe nicht sehr weit von der Wirklichkeit entfernt sein.

Eine passende Menge Stammlösung (je nach der Menge des vorhandenen Phosphors 5—20 ccm) wurde einige Zeit zum Sieden erhitzt, um die etwa vorhandenen Eiweißkörper durch Hitze zu koagulieren. Bei der Hauptfraktion (D) war dies nicht nötig, da sie nach der Dialyse eiweißfrei war. Bei den übrigen Fraktionen ergab sich nur ein sehr geringes Koagulum, da die in der Fleischbrühe enthaltenen Eiweißstoffe durch Hitze nicht fällbar und höchstens durch das lange Aufbewahren teilweise „denaturiert“ sind. Nach dem Filtrieren und gründlichen Nachwaschen des Koagulums mit siedend heißem Wasser wurde erkaltet gelassen und das Filtrat samt Waschwassern auf 100 ccm aufgefüllt. Aliquote Teile dieser Lösung dienten zur Phosphorbestimmung.

Die Lösung wurde mit entsprechenden Mengen destillierten Wassers auf 80 ccm gebracht, auf dem Wasserbad auf etwa 60° erwärmt, mit 10 g Ammoniumnitrat versetzt, mit 3 ccm Salpetersäure (Spez. Gew. 1,2) angesäuert, und nun wurden in raschem Strahle unter gutem Umrühren 50 ccm 3%-ige warme Ammoniummolybdatlösung zugegeben. Dann wurde unter häufigem Umrühren zuerst $\frac{1}{4}$ Stunde auf dem Wasserbade, dann 2 Stunden an einem warmen Orte stehen gelassen und der Niederschlag hierauf durch ein kleines Filter dekantiert. Es war nicht gerade leicht, den Niederschlag rein gelb zu bekommen, sehr häufig war er mißfarbig grün, was jedenfalls ein Zeichen dafür war, daß die Fällung nicht vorschriftsgemäß erfolgte. Man beginnt dann am besten von vorn. Der Niederschlag wurde nun mit 50 ccm Waschflüssigkeit (200 g Ammoniumnitrat + 160 ccm Salpetersäure zu 4 l gelöst), einmal gewaschen und dekantiert. Nachdem die Waschflüssigkeit vollständig abgelaufen war, wurde der auf dem Filter und im Becherglase befindliche Niederschlag mit 10—12 ccm einer 8%-igen Ammoniaklösung gelöst und das Filter mit Wasser gut ausgewaschen. Man füllte mit Wasser auf etwa 200 ccm auf, versetzte mit 6,5 g Ammoniumnitrat und 1 ccm Ammoniummolybdatlösung, erwärmte auf 60° und fällte unter gutem Umrühren durch rasches Zugeben von 20 ccm Salpetersäure (1,2) zum zweiten Male. Auch jetzt wurde einige Zeit in der Wärme stehen gelassen und nun wieder durch ein kleines Filter dekantiert. Der Niederschlag wurde durch 3—4-maliges Waschen mit je 150 ccm Wasser säurefrei gewaschen und nun mit gemessenen Mengen $\frac{1}{2}$ N.-Natronlauge aufgelöst. Es wurde ein Überschuß von etwa 6—8 ccm Lauge hinzugesetzt und nun zum Sieden erhitzt, bis alles Ammoniak völlig ausgetrieben war. Nach dem Abkühlen unter der Wasserleitung mußten einige Tropfen Phenolphthaleinlösung eine kräftige rote Farbe ergeben. War dies nicht der Fall, so wurde mehr Lauge zugesetzt und das Kochen wiederholt. Nun wurde mit $\frac{1}{2}$ N.-Schwefelsäure zurücktitriert und ein kleiner Überschuß hinzugefügt, worauf zur Vertreibung der Kohlensäure nochmals zum Sieden erhitzt wurde. In der Siedehitze wurde mit der $\frac{1}{2}$ N.-Natronlauge auf schwaches Rot titriert, wobei vorsichtig verfahren werden muß, da die Farbentöne infolge Eigenfärbung der Lösung oft nicht rein sind.

Die gefundenen Zahlen sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt und verwertet.

Tabelle 8.
Zusammenstellung und Kontrolle der gefundenen Werte für anorganisch gebundenen Phosphor.

1	2	3	4	5	6
Versuchs- Nr. 1611	Zahl der Bestim- mungen	In 10 ccm Stamm- lösung mg	In 100 g Trocken- substanz %	In x g Trocken- substanz g	x
A	geschätzt	—	3,052 ¹⁾	3,052 ¹⁾	100,00
B	—	—	—	—	28,946
B ₁	—	—	—	—	2,980
C	2	19,434	4,215	2,940	69,760
B+B ₁ +C	—	—	—	2,940	—
Differenz { g gegen A { %	— —	— —	— —	—0,112 —3,67	— —
D	6	124,740	8,749	1,927	22,020
D ₁	geschätzt	—	16,255	0,432	2,657
D ₂	berechnet	—	8,749	0,123	1,409
E	4	7,481	1,951	0,682	34,980
D+D ₁ +D ₂ +E	—	—	—	3,164	—
Differenz { g gegen C { %	— —	— —	— —	+0,112 +3,67	— —

Nach Emmet und Grindley enthalten die Eiweißkörper, Albumosen und Peptone der Fleischbrühe keinen Phosphor, und der organische Phosphor rührt also von nicht eiweißartigen Verbindungen her.

Auch der Gehalt der Fleischbrühe an Lecithin und sonstigen Phosphatiden dürfte = 0 zu setzen sein; diese Körper sind durchweg löslich in Alkohol und müßten sich also im alkoholischen Extrakt B nachweisen lassen. Diese Fraktion ist aber, wie aus mehrfachen Versuchen hervorgeht, phosphorfrei, woraus mit genügender Sicherheit auch auf die Abwesenheit dieser Körpergruppe geschlossen werden kann.

Somit bleiben eigentlich nur drei, bisher im Fleisch und seinen Extrakten nicht nachgewiesene Substanzen, denen der Gehalt an organisch gebundenem Phosphor zu verdanken ist:

1. Glycerinphosphorsäure $C_3H_9O_6P$ (mit 18 % Phosphor),
2. Inosinsäure $C_{10}H_{13}O_8N_4P$ (mit 9 % Phosphor),
3. Phosphorfleischsäure, deren Konstitution und Phosphorgehalt unbekannt ist.

Für keine dieser Verbindungen gibt es eine quantitative Bestimmungsmethode; sie haben ferner stark verschiedenen Phosphorgehalt, und es bleibt daher nur übrig, den organisch gebundenen Phosphor als solchen in Rechnung zu setzen.

Der anorganisch gebundene Phosphor kann nur aus Phosphaten herrühren. Gewöhnlich nimmt man an, daß die Phosphorsäure an Kalium gebunden sei, doch ist es wahrscheinlich, daß sich auch die übrigen vorhandenen Metalle an der Salz-

¹⁾ Geschätzter Mittelwert aus C und D + D₁ + D₂ + E.

bildung beteiligen, ähnlich wie dies schon beim Chlor ausgeführt wurde. Deshalb wurde auch hier darauf verzichtet, den einfachen Phosphorwert noch in irgendein Phosphat umzurechnen.

Die folgende Tabelle 9 zeigt die Aufspaltung des Gesamt-Phosphors in anorganisch und organisch gebundenen Phosphor.

Tabelle 9.
Verteilung des Phosphors.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fraktion	Anorganisch gebundener Phosphor			Organisch gebundener Phosphor			Gesamt-Phosphor	
	In 100 g Trocken-substanz %	In x g Trocken-substanz g	In 100 g Gesamt-Phosphor %	In 100 g Trocken-substanz %	In x g Trocken-substanz g	In 100 g Gesamt-Phosphor %	In 100 g Trocken-substanz %	In x g Trocken-substanz g
A	3,05	3,05	78,81	0,82	0,82	21,19	3,87	3,87
B	0	0	0	0	0	0	0	0
B ₁	0	0	0	0	0	0	0	0
C	4,22	2,94	74,80	1,46	1,02	25,70	5,68	3,96
D	8,75	1,93	87,24	1,28	0,28	12,76	10,03	2,21
D ₁	16,26	0,43	100,00	0	0	0	16,26	0,43
D ₂	8,75	0,12	87,24	1,28	0,02	12,76	10,03	0,14
E	1,95	0,68	67,71	0,93	0,33	32,29	2,88	1,01

10. Bestimmung der Glutaminsäure.

Für die Bestimmung dieses geschmacklich wohl wichtigsten Teiles der Fleischbrühe existiert bisher noch keine ganz einwandfreie Methode. Die gewöhnlich angewandte Bestimmungsart beruht auf der Schwerlöslichkeit des Glutaminsäurechlorhydrats in kalter konzentrierter Salzsäure. Diese Schwerlöslichkeit ist ein relativer Begriff, und es ist sicher, daß merkliche Mengen Glutaminsäure der Bestimmung entgehen müssen; der Fehler wird um so kleiner, je größer die verarbeitete Menge des Analysengutes ist und in je konzentrierterer Lösung man arbeitet. Da nur begrenzte Mengen verfügbar waren, so stellen die erhaltenen und in der folgenden Tabelle zusammengestellten Zahlen nur Minima dar. Es ist klar, daß sie auch nur sehr angenähert vergleichbar sind, da die zur Bestimmung angewandten Materialmengen verschieden groß gewählt werden mußten. Außerdem scheint die Leichtigkeit, mit der sich das Glutaminsäurechlorhydrat abscheidet, mit dem gerade behandelten Proteingemisch und mit der Menge der vorhandenen Glutaminsäure zu wechseln.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit beschreibt F. W. Foreman¹⁾ eine neue Methode, die quantitative Resultate geben soll. Sie beruht auf der Überführung der Glutaminsäure in das Calciumsalz und dessen Abscheidung mit Hilfe von Alkohol. Allein diese Methode ist sehr umständlich, und es werden außer der Glutaminsäure noch andere Aminosäuren (Asparaginsäure, Pyrrolidoncarbonsäure und weitere noch nicht identifizierte Substanzen) ausgefällt, von denen wieder getrennt werden muß, sodaß die alte Methode vorgezogen wurde.

Zur Erläuterung meines Vorgehens sei im folgenden die Bestimmung der Glutaminsäure im ersten Dialysat (D) beschrieben:

200 ccm Stammlösung vom spez. Gewicht 1,076 wurden in einen 500 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben gegeben und mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen

verschlossen. Durch den Stopfen ging bis auf den Boden des Gefäßes ein dünnes Gaseinleitungsrohr und ein zweites, kürzeres Rohr zur Ableitung der Gase. Unter Kühlung mit Eiswasser wurde nun ein lebhafter Strom trockenen Salzsäuregases eingeleitet, bis die Flüssigkeit damit gesättigt war, was durch Wägung kontrolliert wurde. Dann wurde der Kolben 48 Stunden auf Eis stehen gelassen. Die kalte Flüssigkeit wurde durch einen Gooch-Tiegel filtriert, mit wenig eiskalter Salzsäure nachgewaschen und der Tiegel samt Inhalt bei 100—105° getrocknet. Das Filtrat samt der Waschsäure wurde auf dem Wasserbad konzentriert, bis das Volumen noch etwa 70 ccm betrug, mit etwa 30 ccm Wasser wieder in den Erlenmeyer-Kolben gespült und hierauf von neuem unter Eiskühlung mit trockenem Salzsäuregas gesättigt. Der aufs neue entstandene krystallinische Niederschlag wurde nach 48-stündigem Stehen im Eisschrank durch den nämlichen Gooch-Tiegel filtriert wie das erste Mal. Nach dem Nachwaschen mit eiskalter Salzsäure und Trocknen betrug das Gewicht des Gesamtniederschlags 9,07 g. Bei einer nochmaligen Wiederholung dieser Operation wurde aus dem Filtrat kein Niederschlag mehr erhalten.

Der Inhalt des Gooch-Tiegels wurde nun vorsichtig und quantitativ mit heißem Wasser gelöst, die Lösung in einer Glasschale zur Trockne gebracht, und in gewogenen Teilen davon der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Tabelle 10.
Zusammenstellung und Kontrolle der Glutaminsäurewerte.

1	2	3	4	5	6	7
Versuchs- Nr. 1612 u. 1616	Zahl der Bestim- mungen	In 100 g Trockensubstanz			In x g Trockensubstanz % freie Glutaminsäure	x
		Freie Glutamin- säure %	Mono- kaliumsalz %	Mono- calciumsalz %		
A	geschätzt	0,960	1,209	1,084	0,960	100,0
B	1	0,609	0,766	0,688	0,176	28,946
B ₁	0	0	0	0	0	2,980
C	2	1,124	1,415	1,270	0,784	69,760
B+B ₁ +C	—	—	—	—	0,960	—
Differenz { g gegen A { %	—	—	—	—	0	—
	—	—	—	—	0	—
D	3	3,665	4,614	4,139	0,807	22,020
D ₁	0	0	0	0	0	2,657
D ₂	berechnet	3,665	4,614	4,139	0,052	1,409
E	2	0	0	0	0	34,980
B+B ₁ +D+ D ₁ +D ₂ +E	—	—	—	—	1,035	—
Differenz { g gegen A { %	—	—	—	—	+0,075	—
	—	—	—	—	+7,80	—

0,4825 g Substanz enthielten 5,324 mg Stickstoff.

In 9,07 g Substanz aus 200 g Stammlösung (entsprechend 28,512 g Trockensubstanz) demnach 99,52 mg Stickstoff oder 1,045 g freie Glutaminsäure.

In 100 g Trockensubstanz 3,665 g freie Glutaminsäure.

Außer dieser wurden noch zwei weitere Analysen ausgeführt, die indessen nicht ganz so hohe Resultate ergaben. Trotzdem wurde hier nicht der Mittelwert, sondern der höchste Wert in die Tabelle eingesetzt, da, wie eingangs erwähnt wurde, bei der Glutaminsäurebestimmung stets ziemliche Verluste in Betracht zu ziehen sind.

Da die Glutaminsäure in der Fleischbrühe sicher nicht in freiem Zustand vorkommt, so finden sich in der Tabelle 10 auch die auf Monokalium- und Monocalciumsalz umgerechneten Werte.

11. Bestimmung der Aminosäuren.

Es war naturgemäß von größter Wichtigkeit, zu wissen, ob außer der Glutaminsäure noch andere Aminosäuren in der geschmacklich wichtigsten Fraktion, dem ersten Dialysat, vorhanden sind. Es gibt nur sehr wenige Reaktionen, die auf die Anwesenheit von Aminosäuren in Gemischen mit Sicherheit schließen lassen, und die beste ist wohl die Überführung der Aminosäuren in ihre Esterchlorhydrate, die Abscheidung und Isolierung der freien Ester und die Rückverseifung zu den Aminosäuren. Als Kennzeichen für das Fortschreiten der Operation diene die Abderhalden'sche Reaktion mit Triketohydrinden (Ninhydrinreaktion). Sie ist, wie die Arbeiten von E. Halle, Löwenstein, E. Pribram, C. Neuberg, E. Herzfeld u. a. zeigen, zwar nicht charakteristisch für Aminosäuren allein, sondern sie wird auch mit einer Reihe von Alkohol-, Aldehyd- und Keto-Gruppen enthaltenden Substanzen erhalten, und ebenso mit Peptonen, Albumosen, Albuminen usw. Die letzteren sind im ersten Dialysat ausgeschaltet, die ersteren können vielleicht vorhanden sein, doch stören sie nicht, wie weiter unten gezeigt wird. Es schien überhaupt von Interesse, zu sehen, wie sich auch die übrigen Fraktionen der festen Fleischbrühe gegenüber der Ninhydrinreaktion verhalten, und es wurde gleichzeitig noch die Biuretprobe (auf Eiweiß) und die Millon'sche Reaktion (auf Tyrosin und Eiweiß) zur Untersuchung herangezogen. Das Resultat findet sich in der kleinen Zusammenstellung, in der das Pluszeichen positiven und das Minuszeichen negativen Ausfall der Reaktion bedeutet. Durch Wiederholung der Zeichen soll ein ungefähres Bild über die Stärke der eingetretenen Reaktion gegeben werden.

Tabelle 11.

	Fraktion	Reaktion gegen Lakmus	Ninhydrin- Reaktion	Millon'sche Reaktion	Biuret- Reaktion
A	Feste Fleischbrühe . .	neutral	+++	++	+
B	Alkohollöslicher Teil .	stark sauer	±	schwach +	—
C	Alkoh unlöslicher Teil	neutral	+	++	+
D	Erstes Dialysat . . .	schwach alkalisch	++	—	—
E	Nichtdialysiertes . . .	neutral	+++	+++	+

Daraus geht hervor, daß die ursprüngliche Fleischbrühe, der alkohollösliche Teil und das, was nicht mehr dialysierte, auf alle drei Reaktionen positiv ansprechen, somit Aminosäuren und Eiweißkörper enthalten. Im alkohollöslichen Teil sind höchstens Spuren von Aminosäuren, aber kein Eiweiß enthalten und im ersten Dialysat Aminosäuren und ebenfalls kein Eiweiß.

Zur eigentlichen Bestimmung der übrigen Aminosäuren diene das stark salzsaure Filtrat samt Wasch-Salzsäure von dem im Gooch-Tiegel gesammelten, durch gasförmige Salzsäure aus 200 ccm Stammlösung D ausgefallten Glutaminsäurechlorhydrat (siehe den vorigen Abschnitt).

Dieses Filtrat zeigte nach dem Neutralisieren einer kleinen Probe nur noch ganz verschwindende, schwach rötliche Ninhydrin-Reaktion, sodaß angenommen werden mußte, daß die Glutaminsäure die weitaus vorherrschende der vorhandenen Aminosäuren sei, und daß die übrigen Säuren dieser Gruppe jedenfalls nur in sehr geringen Mengen vorhanden waren.

Trotzdem wurde dieses Filtrat weiter behandelt, wie wenn noch weitere Aminosäuren vorhanden wären. Zu diesem Zwecke wurde es im Vakuum zur Trockne verdampft; die Badtemperatur betrug 60°; sie hätte unbedenklich noch höher sein können, da die Gefahr einer weitergehenden Hydrolyse nicht vorlag. Der von Wasser und Salzsäure möglichst befreite Sirup wurde nun mit 150 ccm absolutem Alkohol versetzt, ohne Kühlung mit trockenem Salzsäuregas gesättigt, zur Vervollständigung der Veresterung $\frac{1}{2}$ Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt und hierauf im Vakuum zur Trockne verdampft. Diesmal betrug die Badtemperatur höchstens 50°, um eine Wiederverseifung der gebildeten Ester zu vermeiden. Der erhaltene Sirup wurde nochmals der gleichen Operation unterworfen und nach dem völligen Eindampfen mit absolutem Alkohol aufgenommen. Dabei blieben 3,3 g krystallinische Salze ungelöst, von denen abfiltriert wurde. Das klare Filtrat wurde in einem Meßkolben mit absolutem Alkohol auf 250 ccm aufgefüllt und in 5 ccm davon der Chlorgehalt bestimmt. Die Chlorbestimmung ergab einen Gehalt von 4,818 g Chlor in den übrigen 245 ccm, und dementsprechend wurde die mit einer Kältemischung gekühlte Lösung mit einer ebenfalls eiskalten Auflösung von 3,124 g metallischem Natrium in 120 ccm absolutem Alkohol unter Umrühren und ständiger Kühlung versetzt. Die Ausscheidung von Natriumchlorid wurde durch Zugabe von 250 ccm Äther noch vervollständigt. Die ausgeschiedenen Salze (22,30 g) wurden nach halbstündigem Stehen in der Kälte abgesaugt, mit 250 ccm Äther nachgewaschen und getrocknet.

Das alkoholisch-ätherische Filtrat, das die freien Aminosäureester hätte enthalten müssen, wurde bei ganz niedriger Temperatur im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die Vorlage war mit 20 ccm verdünnter Salzsäure beschickt, um auch flüchtige Ester aufzufangen, doch hinterblieb beim nachherigen Eindampfen der Vorlagenflüssigkeit auf dem Wasserbade nur ein Hauch von fester Substanz.

Der Destillationsrückstand wurde sofort mit 3×250 ccm Äther je $\frac{1}{2}$ Stunde ausgezogen, um die freien Ester von den übrigen Begleitstoffen abzutrennen. Die vereinigten ätherischen Extrakte waren ganz schwach gelb gefärbt. Sie hinterließen nach dem Eindampfen einen neutral reagierenden Sirup. Dieser Sirup wurde, um jede Anhydridbildung zu vermeiden, sofort mit 200 ccm Wasser eine Stunde gekocht. Nach dieser Zeit reagierte die Flüssigkeit stark sauer, mit Ninhydrin trat auch nach Anwendung einer größeren Menge nicht die geringste Reaktion ein. Aus der ursprünglich neutralen Reaktion der Flüssigkeit läßt sich schließen, daß keine Ester von Monoaminosäuren, die alkalisch hätten reagieren müssen, vorhanden waren, und der negative Ausfall der Ninhydrinreaktion beweist, daß Aminosäuren überhaupt nicht vorhanden waren. Die durch Filtration von einer geringen Trübung befreite Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, wobei ein heller, leichtflüssiger Sirup in einer Menge von nicht ganz 1 g hinterblieb.

Der Sirup zeigte die folgenden Reaktionen:	Demnach sind vorhanden:
Silberlösung wurde in der Wärme reduziert . . .	} Ameisensäure
Quecksilberchloridlösung wurde in der Wärme zu	
Chlorür reduziert	

Ferrichlorid erzeugte eine rote Färbung. . . .

Essigsäure und etwa
höhere Homologe

Eine blaue Lösung von Phenol und Ferrichlorid

(Uffelmann's Reagens) wurde sofort gelb gefärbt

Milchsäure

Es zeigte sich also, daß durch die Behandlung der ursprünglichen Stammlösung mit Salzsäuregas die Glutaminsäure vollständig abgeschieden worden war und daß außer ihr keine anderen Aminosäuren im ersten Dialysat vorhanden waren, sondern nur die schon früher bestimmten niedrigen Fettsäuren und Oxyfettsäuren. Infolge des Fehlens charakteristischer Reaktionen und der geringen vorhandenen Menge war es nicht möglich, zu entscheiden, ob auch noch höhere Säuren in dem Gemisch vorlagen.

Die Bestimmung der Aminosäuren wurde, ihrer sehr umständlichen Durchführung wegen, nur beim ersten Dialysat vorgenommen. Es wäre recht interessant, noch zu untersuchen, ob sich weitere Aminosäuren in dem nicht dialysierten Teil finden, denn es ist unwahrscheinlich, daß außer der Glutaminsäure keine anderen Aminosäuren in der Fleischbrühe vorkommen sollen.

Die Fleischbrühe als solche ist, wie aus der Literatur hervorgeht, noch nie in dieser Richtung durchforscht worden. Da sie aber prinzipiell die gleichen Extraktivstoffe enthält wie der Fleischextrakt, so muß geschlossen werden, daß sie auch die anderen, neben Glutaminsäure in diesem Produkt nachgewiesenen Aminosäuren enthält.

K. Micko¹⁾, der den Fleischextrakt auf seinen Gehalt an Aminosäuren untersuchte, gelang es, neben der Glutaminsäure noch Alanin aufzufinden.

Sieht man die Literatur durch, so findet man, daß auch Leucin und Tyrosin in den meisten tierischen Geweben vorkommen und daß ferner Arginin recht häufig angetroffen wird. Allein man stößt nirgends auf Angaben über ein Vorkommen dieser Aminosäuren im Fleischextrakt oder in der Fleischbrühe. Ebenso vermißt man Angaben über die beiden recht charakteristisch schmeckenden und in Lösung nach Fleischbrühe riechenden Aminosäuren Serin und Prolin.

Waren somit die Aussichten, freie Aminosäuren im ersten Dialysat, wo sie am ehesten hätten vorkommen müssen, zu finden, nicht gerade große, so mußte ihre Isolierung noch aus weiteren Gründen auf Schwierigkeiten stoßen. Einmal sind diese Aminosäuren sicher nur in sehr kleinen Mengen vorhanden und infolge des Fehlens charakteristischer Bestimmungsmethoden an sich schon schwer nachzuweisen; dann kommt hinzu, daß die zur Isolierung fast allein geeignete Estermethode von E. Fischer mit bedeutenden Verlusten arbeitet. Nach Plimmer (Chemische Konstitution der Eiweißkörper) hat man für die Isolierung von Alanin, Serin, Asparaginsäure, Cystin und Tryptophan mit 50%, für Valin, Prolin, Glutaminsäure, Phenylamin mit 30% und für Leucin mit 20% Verlusten zu rechnen.

Nachdem auch die Abderhalden'sche Reaktion nach der Entfernung der Glutaminsäure aus dem ersten Dialysat versagte, kann wohl als sicher angenommen werden, daß diese geschmacklich wichtige Fraktion keine anderen Abbauprodukte von Eiweißkörpern enthält, oder dann nur so geringfügige Mengen, daß sie dem Nachweis entgehen und auch für die Geschmacksbildung nicht in Frage kommen.

Wenn überhaupt noch andere Aminosäuren außer der Glutaminsäure in der Fleischbrühe vorhanden sind, so müssen sie sich in der letzten, nicht völlig dialysierten Fraktion befinden und ähnlich wie der Rest der Glutaminsäure der Dialyse entgangen sein.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1908, 56, 211.

12. Bestimmung von Kreatin und Kreatinin.

Die Bestimmung dieser beiden wichtigsten Bestandteile aller Fleischextrakte wurde nach der Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuches auf colorimetrischem Wege ausgeführt. Die nachfolgenden beiden Tabellen 12 und 13 zeigen die Verteilung von präformiertem Kreatinin, Gesamt-Kreatinin und (daraus berechnetem) präformiertem Kreatin in den verschiedenen Fleischbrühefraktionen und ferner die Stickstoffwerte der einzelnen Fraktionen in % der Trockensubstanz und des Gesamt-Stickstoffes.

Tabelle 12. Zusammenstellung und Kontrolle der gefundenen Kreatinin- und Kreatinwerte.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Versuchs-Nr.	In 10 ccm Stamm-lösung		In 100 g Trockensubstanz			In x g Trockensubstanz		
1615	Prä-formiertes Kreatinin mg	Gesamt-Kreatinin mg	Prä-formiertes Kreatinin %	Gesamt-Kreatinin %	Prä-formiertes Kreatin %	Prä-formiertes Kreatinin g	Gesamt-Kreatinin g	Prä-formiertes Kreatin g
A	29,355	49,642	3,021	5,107	2,420	3,021	5,107	2,420
B	6,740	13,650	0,896	1,815	1,066	0,259	0,525	0,308
B ₁	—	—	—	46,603	—	—	1,326	—
C	1,878	17,440	0,407	3,782	3,915	0,284	2,638	2,731
B+B ₁ +C	—	—	—	—	—	—	4,489	—
Differenz { g gegen A { %	— —	— —	— —	— —	— —	— —	—0,618 —12,10	— —
D	20,420	55,680	1,432	3,906	2,869	0,315	0,860	0,632
D ₁	—	—	—	10,547	—	—	0,280	—
D ₂	—	—	1,432	3,906	2,869	—	0,055	—
E	7,320	17,080	1,909	4,448	2,946	0,668	1,556	1,030
D+D ₁ +D ₂ +E	—	—	—	—	—	—	2,751	—
Differenz { g gegen C { %	— —	— —	— —	— —	— —	— —	+0,113 +4,28	— —

Tabelle 13. Zusammenstellung der Kreatinin- und Kreatin-Stickstoffwerte, bezogen auf Trockensubstanz und Gesamt-Stickstoff.

1	2	3	4	5	6	7
Versuchs-Nr.	In 100 g Trockensubstanz			In 100 g Gesamt-Stickstoff		
	Präformiertes Kreatinin g	Gesamt-Kreatinin g	Präformiertes Kreatin g	Präformiertes Kreatinin g	Gesamt-Kreatinin g	Präformiertes Kreatin g
A	1,123	1,898	0,776	9,307	15,736	6,432
B	0,333	0,674	0,342	3,549	7,188	3,641
B ₁	—	17,322	—	—	100,00	—
C	0,151	1,406	1,255	1,261	11,709	10,459
D	0,532	1,452	0,920	5,080	13,851	8,775
D ₁	—	3,920	—	—	100,00	—
D ₂	0,532	1,452	0,920	5,080	13,851	8,775
E	0,709	1,654	0,944	4,725	11,014	6,290

13. Bestimmung der Purinbasen.

Hier wurde zuerst auch nach Harnsäure gefahndet, die bekanntlich in fast allen Organen vorkommt. Es wurde der Analysengang von Krüger und Schmid¹⁾ benutzt, doch zeigte sich bald, daß zumindest im ersten Dialysat, das dieser Prüfung unterworfen wurde, keine Harnsäure vorhanden ist. Bei den späteren Untersuchungen wurde daher auf die Bestimmung dieser Substanz keine Rücksicht mehr genommen, und die Purinbasen wurden direkt nach der Kupferbisulfitmethode bestimmt. Zu den im Muskel vorkommenden Purinbasen gehört vor allem das Hypoxanthin, ferner das Xanthin neben Guanin und Karnin. Das Hypoxanthin überwiegt im Muskel aber so stark, daß die gefundenen Werte auf diese Base umgerechnet wurden, entgegen dem Vorgehen von v. Fellenberg²⁾, der seine Werte auf Purin berechnete.

Im übrigen wurde den Angaben von v. Fellenberg gefolgt, dessen Methodik sich an diejenige von Krüger und Schmid anlehnt. Da die Bestimmung relativ viel Material in Anspruch nimmt, ferner etwas umständlich ist und endlich die Purine jedenfalls nicht zu den Geschmacksträgern gehören, wurde diese Körpergruppe nur im ersten Dialysat, in der ursprünglichen festen Fleischbrühe und in der nicht mehr dialysierten Fraktion bestimmt. Die Puringehalte der Fraktionen B, C und D₂ konnten dann leicht geschätzt oder berechnet werden.

Das Vorgehen, das nach einigen Vorversuchen ausprobiert war, gestaltete sich folgendermaßen:

25 ccm Stammlösung wurden mit 375 ccm Wasser auf 400 ccm verdünnt und 4 Stunden mit 4 ccm konc. Schwefelsäure im Sieden erhalten. Dann wurde mit 33 0/0-iger Natronlauge deutlich alkalisch gemacht, 4 ccm Eisessig und 4 ccm 1/2 N.-Oxalsäure zugesetzt, zum Kochen erhitzt und langsam erkalten gelassen. Von dem so erhaltenen feinen Niederschlag, Calciumoxalat, wurde abfiltriert und nachgewaschen. Nun wurden 40 ccm 40 0/0-ige Natriumbisulfatlösung zugegeben, zum Sieden erhitzt, vorsichtig 40 ccm 10 0/0-ige Kupfersulfatlösung zugesetzt und 3 Minuten im Sieden erhalten. Man ließ 1/4 Stunde auf dem warmen Wasserbad stehen, damit sich der braune Kupferniederschlag absetzte, goß die Flüssigkeit durch ein Faltenfilter und wusch den Niederschlag mit heißem Wasser gut aus. Der ausgewaschene Niederschlag wurde mit heißem Wasser in einen Kolben gespült, mit 20—30 ccm Natriumsulfidlösung (die man sich aus einer 1 0/0-igen Natronlauge bereitet, indem man die eine Hälfte davon mit Schwefelwasserstoff sättigt und darauf mit der anderen Hälfte mischt) versetzt und einige Minuten gekocht. Dann überzeigte man sich mit Bleiacetatpapier, ob genügend Sulfid vorhanden war, säuerte heiß mit Essigsäure an und kochte noch einige Minuten, wobei sich das Kupfersulfid gut abschied, filtrierte durch ein Filter und wusch mit heißem Wasser aus. Das Filtrat wurde in einer Porzellanschale mit 7 ccm 1/2 N.-Salzsäure auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, mit etwas Wasser versetzt, noch kurze Zeit erwärmt, durch ein kleines Filter gegossen und nachgewaschen. Das Filtrat wurde auf etwa 80 ccm verdünnt, mit verdünnter Natronlauge eben alkalisch gemacht, mit 10 ccm Bisulfatlösung zum Sieden erhitzt, vorsichtig mit 10 ccm Kupfersulfatlösung gefällt und noch 3 Minuten im Sieden erhalten. Der flockige Niederschlag wurde sofort abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und mitsamt dem Filter nach Kjeldahl verbrannt. Durch einen blinden Versuch wurde der Stickstoffgehalt des Filters ermittelt und, wenn nötig, von dem gefundenen Wert abgezogen. 1 mg Purin-Stickstoff entspricht 2,43 mg Hypoxanthin.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1905, 45, 1.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 1918, 88, 327.

Tabelle 14.
Zusammenstellung der Werte für Purin-Stickstoff und Purinbasen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Versuchs-Nr.	Fraktion	Art der Bestimmung	In 25 ccm Stammlösung Purin-N mg	In 100 g Trockensubstanz		In x g Trockensubstanz		In 100 g Gesamt-Stickstoff Purin-N %
				Hypoxanthin %	Purin-N %	Hypoxanthin g	Purin-N g	
695	A	direkt bestimmt	15,736	1,574	0,648	1,574	0,648	5,807
—	B	geschätzt (A—C)	—	3,282	1,350	0,950	0,391	14,390
—	C	geschätzt (D + D ₂ + E)	—	0,894	0,368	0,624	0,257	3,064
696, 1601	D	direkt bestimmt ¹⁾	11,070	0,750	0,309	0,165	0,068	2,950
—	D ₂	berechnet (aus D)	—	0,750	0,309	0,010	0,004	3,431
1614	E	direkt bestimmt	5,219	1,323	0,544	0,463	0,191	3,625

14. Bestimmung des Gesamt-Schwefels und der Gesamt-Schwefelsäure.

Das erste Dialysat gab, wenn man eine kleine Probe trocknete und mit Natrium schmolz, sehr deutliche Schwefelreaktionen. Der Schwefelgehalt der Fleischbrühe kann auf das Vorhandensein verschiedener Substanzen zurückgeführt werden; der Schwefel kann darin wie der Phosphor anorganisch und organisch gebunden sein. Als anorganische Schwefelverbindung kommt wohl nur die Schwefelsäure in Betracht, die einesteiis als Sulfat, anderenteils als gebundene Ätherschwefelsäure vorkommt. Als organische Schwefelsäureverbindungen, deren Schwefel erst nach energischer Oxydation bestimmt werden kann, sind u. a. anzuführen Cystin und Taurin.

Es wurde sowohl der Gesamt-Schwefel, wie auch der Gehalt an Gesamt-Schwefelsäure bestimmt. Die erstere Zahl umfaßt den Schwefel aus sämtlichen vorhandenen Schwefelverbindungen, die letztere nur den Schwefel aus anorganisch gebundener und Ätherschwefelsäure.

Die Bestimmung des Gesamt-Schwefels erfolgt am bequemsten auf nassem Wege nach dem von Kanschegg²⁾ modifizierten Verfahren von Schulz³⁾.

10 ccm Stammlösung D (erstes Dialysat) wurden in einem Kjeldahl-Kolben mit 2,3 ccm 20%iger Kaliumnitratlösung und 10 ccm rauchender Salpetersäure versetzt, bis zur Vertreibung der braunen Dämpfe auf freier Flamme, hernach noch etwa 1/2 Stunde auf dem Babobelech erhitzt, bis sich am Kolbenhals keine Flüssigkeitstropfen mehr niederschlugen. Nach dem Erkalten wurden 100 ccm Wasser und 10 ccm 1/2 N.-Salzsäure zugegeben, zum Sieden erhitzt und quantitativ in ein Becherglas gespült. Die siedende Lösung wurde mit 10 ccm heißer N.-Bariumchloridlösung versetzt und bis zur völligen Ausscheidung des Bariumsulfatniederschlags

¹⁾ Mittel aus 2 Bestimmungen.²⁾ Pflüger's Archiv 1908, 123, 174.³⁾ Pflüger's Archiv 1908, 121, 114.

im siedenden Wasserbade stehen gelassen. Der Niederschlag wurde auf ein kleines aschefreies Filter gebracht, gut ausgewaschen, mit dem Filter getrocknet, im Platintiegel verbrannt und mäßig geglüht. Es wurden 0,0535 g Bariumsulfat erhalten.

Demnach finden sich:

In 10 ccm Stammlösung = 1,4256 g Trockensubstanz	{	22,48 mg Schwefelsäure aus Gesamt-Schwefel
In 100 g Trockensubstanz	{	1,577 g Schwefelsäure aus Gesamt-Schwefel
		0,516 g Gesamt-Schwefel

Die Gesamt-Schwefelsäure wurde nach dem Verfahren von E. Salkowski¹⁾ zweimal bestimmt. 10 ccm Stammlösung wurden auf 100 ccm verdünnt, 10 ccm 2 N.-Salzsäure hinzugefügt und 15 Minuten im Sieden erhalten. Dann wurde die Flamme beiseite gestellt und nach einigen Minuten mit 15 ccm kochender N.-Bariumchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wurde einige Zeit stehen gelassen, hierauf durch ein aschefreies Filter gegeben und wie oben behandelt. Es ergaben sich die folgenden Werte:

	I. Bestimmung	II. Bestimmung	Mittel
In 10 ccm Stammlösung = { 1,4256 g Trockensubstanz	12,94	12,77	12,86 mg Gesamt-Schwefelsäure
In 100 g Trockensubstanz	0,908	0,896	0,902 % „
In 100 g Reinasche . . .	1,920	1,895	1,907 % Gesamt-Schwefelsäure
Von 100 g Gesamt-Schwefel	57,19 %	Schwefel aus Gesamt-Schwefelsäure.	

Die Bestimmungen des Gesamt-Schwefels und der Gesamt-Schwefelsäure (m. a. W. des anorganisch gebundenen Schwefels) ermöglichen auch die Berechnung des organisch gebundenen Schwefels. Die direkt bestimmte Gesamt-Schwefelsäure entspricht einem Gehalt von 0,295 g anorganisch gebundenem Schwefel in 100 g Trockensubstanz. Die Differenz Gesamt-Schwefel minus anorganisch gebundener Schwefel ergibt einen Gehalt von 0,221 % organisch gebundenem Schwefel im ersten Dialysat.

Nimmt man, was sehr wahrscheinlich ist, an, daß in dieser Fraktion außer Taurin oder Cystin keine anderen schwefelhaltigen Substanzen vorkommen, so kann man den organisch gebundenen Schwefel auf eine dieser beiden Verbindungen umrechnen und erhält dann außerdem durch weitere Umrechnung einen Wert für Taurin- bzw. Cystin-Stickstoff, was deswegen von Bedeutung ist, weil für diese beiden Verbindungen direkte Bestimmungsmethoden fehlen.

Da Taurin einen ähnlichen Schwefelgehalt wie Cystin aufweist, und bei beiden das Verhältnis Schwefel : Stickstoff das gleiche ist, so ist es das beste, in die späteren zusammenfassenden Tabellen den Mittelwert zwischen Taurin- und Cystingehalt einzusetzen.

In 100 g Trockensubstanz des ersten Dialysats sind, nach Umrechnung des organisch gebundenen Schwefels, enthalten 0,855 % Taurin oder 0,820 % Cystin, im Mittel 0,830 % Taurin oder Cystin mit einem Stickstoffgehalt von 0,096 %.

15. Bestimmung der Fleischbasen im ersten Dialysat.

Angesichts der zeitraubenden Operationen, die vorgenommen werden müssen, um Körper wie Carnosin, Carnitin und Methylguanidin überhaupt zu Gesicht zu bekommen, wobei natürlich nur angenähert quantitativ gearbeitet werden kann, wurde nur das erste Dialysat als wichtigste Fraktion der Fleischbrühe zur Untersuchung

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1886, 10, 346 und Virchow's Archiv 1873, 58, 469.

verwendet. Die schönen Arbeiten von Gulewitsch und Krimberg¹⁾ gaben gute Anhaltspunkte über den einzuschlagenden Weg. Die Resultate sollen, wie überhaupt alle nur einmal erhaltenen, mit Vorsicht verwertet werden, da auf diesem recht wenig begangenen Gebiet nur nach langer Übung einige Sicherheit erlangt werden kann.

Zur Entfernung von Chloriden, Sulfaten und Phosphaten wurden 47,07 ccm Stammlösung D (entsprechend 6,710 g Trockensubstanz) mit einer 20%-igen Lösung von essigsaurem Blei so lange versetzt, als noch eine Fällung entstand; hierzu waren etwa 80 ccm erforderlich. Der starke Niederschlag wurde abgesaugt und mehrere Male mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, um überschüssiges Blei auszufällen, durch Filtration und Auswaschen davon abgetrennt und auf dem Wasserbade auf etwa 75—100 ccm eingeeengt. Diese Lösung wurde nun mit einer 30%-igen Phosphorwolframsäurelösung vollständig ausgefällt (Tüpfelprobe), nach Zusatz von 53,6 g Phosphorwolframsäure bildete sich auf erneuten Zusatz kein Niederschlag mehr. Nach zweitägigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt, mit $\frac{1}{2}$ l Wasser gründlich ausgewaschen und nun mit 200—300 ccm Wasser in eine sehr geräumige Flasche gespült. Nach Zufügen einer warmen Lösung von 107 g Barythydrat in 600 ccm Wasser wurde 4 Stunden auf der Maschine geschüttelt, vom Bariumphosphorwolframat abgesaugt und letzteres sehr gut ausgewaschen. Aus dem Filtrat wurde das überschüssige Barythydrat durch Sättigen mit Kohlensäure als Bariumcarbonat ausgeschieden, abfiltriert und gewaschen. Das klare Filtrat wurde mit wenigen Tropfen verdünnter Salpetersäure neutralisiert und auf dem Wasserbade eingeeengt. Es resultierte eine von vielen Krystallen durchsetzte Masse, die mit 40 ccm Wasser aufgenommen und durch Filtration von einem geringen, bräunlichen, amorphen Niederschlage befreit wurde.

Die klare Lösung wurde vorsichtig mit einer 20%-igen Silbernitratlösung versetzt, bis gerade kein Niederschlag mehr entstand, wozu nur wenige ccm der Silberlösung erforderlich waren. Der amorphe Silberniederschlag I (0,30 g) enthält die Purinbasen; ein Teil wurde zu einer Stickstoffbestimmung verwendet, die folgende Resultate hatte:

0,2415 g enthalten 18,14 mg Purin-Stickstoff; in 0,30 g Silberniederschlag I aus 6,710 g Trockensubstanz sind demnach 22,54 mg Purin-Stickstoff enthalten.

100 g Trockensubstanz enthalten 0,336 g Purin-Stickstoff oder 0,816 g Hypoxanthin; von 100 g Gesamt-Stickstoff sind 3,205% Purin-Stickstoff.

Diese Zahlen sind ein geringes höher als die bei der eigentlichen Purinbestimmung gefundenen; sie wurden bei der Berechnung des mittleren Puringehaltes dieser Fraktion benutzt.

Das klare Filtrat vom Silberniederschlag I samt den Waschwässern wurde nun weiter vorsichtig mit 20%-iger Silbernitratlösung versetzt, bis bei der Tüpfelprobe mit Barythydrat ein sofort gelb, braun und schwarz werdender Niederschlag entstand. Hierzu waren etwa 6 ccm Silberlösung nötig. Die klare Lösung wurde nun mit einer etwa 40%-igen warmen Barythydratlösung gefällt, wobei sich der entstehende Niederschlag anfänglich noch löste, später aber, nach Zusatz von etwa 10 ccm der Barytlösung bleibend wurde und sich nicht mehr vermehrte. Der so entstandene braunschwarze Silberniederschlag IIa wurde abgesaugt, gewaschen und auf Carnosin-nitrat verarbeitet. Im Filtrat bildete sich bei mehrtägigem Stehen noch mehr Niederschlag (IIb), der gleich wie IIa behandelt wurde.

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1900, 30, 565; 1905, 45, 326; 1906, 47, 471, 48, 412, 49, 89, 50, 204 usw.

Beide Niederschläge wurden mit je 100 ccm Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff vom Silber und das klare Filtrat durch Einleiten eines Luftstromes vom Schwefelwasserstoff befreit. Nun wurde mit Kohlensäure gesättigt, um das noch in Lösung befindliche Barythydrat völlig zu fällen, und vom entstandenen Bariumcarbonat abfiltriert. Die klaren Lösungen wurden auf dem Wasserbade eingeeengt, vorsichtig mit verdünnter Salpetersäure neutralisiert und weiter eingedampft, wobei sie zu einer krystallinischen Masse von Carnosinnitrat erstarrten, die im Vakuum völlig getrocknet wurde. Es ergaben sich folgende Werte:

	IIa	IIb	Zusammen	
Ausbeute aus 6,710 g Trockensubstanz	0,55 g	0,20 g	0,75 g	} Carnosin-
In 100 g Trockensubstanz	8,20 „	2,98 „	11,18 „	
In 100 g „	1,59 „	0,58 „	2,17 „	} Carnosin-
Von 100 g Gesamt-Stickstoff	15,16 „	5,51 „	20,67 „	
				} Stickstoff

Das Filtrat samt Waschwässern von den beiden Silberniederschlägen IIa und IIb wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Silber befreit, das Filtrat vom Schwefelsilber mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure neutralisiert, mit 2 g Magnesiumoxyd versetzt und auf dem Wasserbade stark eingeeengt, um das Ammoniak zu vertreiben. Die fast trockene Masse wurde hierauf mit Wasser angerieben, die Schwefelsäure mit nicht zu viel Barythydrat ausgefällt, filtriert und ausgewaschen. Zur Vorsicht wurde, um etwa vorhandenes überschüssiges Bariumhydroxyd auszufällen, mit Kohlensäure gesättigt, und, da sich keine Fällung ergab, direkt mit verdünnter Salpetersäure genau neutralisiert. Die solchermassen erhaltene, vom Ammoniak befreite Lösung wurde nun aufs neue mit 20 %iger Silbernitratlösung versetzt, bis bei der Tüpfelprobe mit Barythydrat ein sofort gelb, braun und schwarz werdender Niederschlag auftrat, worauf die Silberverbindung durch Zufügen von überschüssigem Barythydrat völlig ausgefällt wurde. Dieser Silberniederschlag III wurde abgesaugt, mit Wasser gut gewaschen und auf Methylguanidin, das Filtrat samt Waschwässern auf Carnitin verarbeitet.

Der Silberniederschlag III wurde in 100 ccm Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff behandelt; dann wurde vom Silbersulfid abfiltriert, dieses ausgewaschen, das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert, wobei gleichzeitig das noch in Lösung befindliche Barium ausgefällt und durch Filtration abgetrennt wurde. Die klare Lösung wurde auf dem Wasserbade eingedampft, der entsprechende Sirup im Vakuum getrocknet. Ausbeute 0,366 g.

0,1 g davon wurden in wenig Wasser gelöst und mit etwas Pikrinsäure versetzt. Beim Eindampfen ergaben sich die von Gulewitsch beschriebenen Krystalle: eigelbe, sechseckige Tafeln, welche ziemlich breit und treppenförmig aneinander gewachsen sind.

Der Rest der Substanz wurde zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl benutzt; sie ergab folgende Werte:

0,2700 g Substanz enthalten 20,031 mg Stickstoff; in 0,366 g Substanz aus 6,710 g Trockensubstanz sind demnach 27,154 mg Stickstoff aus Methylguanidin oder 81,489 mg Methylguanidinsulfat enthalten. In 100 g Trockensubstanz sind 0,405 g Stickstoff oder 1,214 g Methylguanidinsulfat; von 100 g Gesamt-Stickstoff entfallen 3,861 g Stickstoff auf Methylguanidin.

Das Filtrat vom Silberniederschlag III wurde mitsamt den Waschwässern mit verdünnter Salzsäure neutralisiert, wobei auch das überschüssige Silber als Chlorid ausfiel und entfernt werden konnte. Nach dem Abfiltrieren vom Silberchlorid wurde

auf dem Wasserbade auf 50 ccm eingengt und nun tropfenweise 3—4 ccm Dragendorffsches Reagens (33%ige Lösung von Wismutkaliumjodid) zugesetzt. Es entstand sehr wenig eines roten Niederschlages, der aber entgegen der Beschreibung von Gulewitsch nicht harzig wurde, sondern feinkörnig blieb.

Nach dem Absetzen und Waschen wurde dieser Niederschlag mit frisch gefälltem Bleihydroxyd (aus 10 g Bleinitrat) tüchtig verrieben, vom gebildeten Bleioxyjodid und vom überschüssigen Bleihydroxyd abfiltriert, mit reichlichen Mengen Wasser nachgewaschen, das noch gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff abgeschieden, nochmals filtriert und die nunmehr jod- und bleifreie Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde nochmals mit warmem absoluten Alkohol ausgezogen, und die alkoholischen Extrakte wurden zur Trockne verdampft. Dabei hinterblieb aber nur so wenig Rückstand, daß auf die weitere Isolierung und Identifizierung des Carnitins verzichtet werden mußte. Dies soll nicht heißen, daß damit die Abwesenheit dieser Base erwiesen ist, denn das Carnitin ist ein sicher vorhandener Bestandteil der Muskelfleischextrakte. Es ist auch hier mit größter Wahrscheinlichkeit vorhanden, aber eben in so geringer Menge, daß es unter den obwaltenden Umständen dem Nachweis entging. Die Beschreibung von Gulewitsch und Krimberg läßt leider Angaben über die von ihnen aus frischen Fleischextrakten erzielten Ausbeuten an Carnitin vermissen.

16. Nachweis der Zuckerarten im ersten Dialysat.

Eine kleine Probe von fester Fleischbrühe, in wenig Wasser gelöst und tropfenweise zu heißer Fehling'scher Lösung gegeben, zeigte keinerlei Reduktionswirkung. Die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern, wie Glykose oder Xylose, die beide vorhanden sein könnten, ist demnach in der festen Fleischbrühe und selbstredend in allen übrigen Fraktionen ausgeschlossen.

Glykogen kann im ersten Dialysat nicht vorhanden sein, denn infolge seiner hochmolekularen, kolloiden Eigenschaften passiert es die tierische Membran nicht und müßte also in der letzten Fraktion (Nichtdialysiertes) zu finden sein.

Es blieb also nur übrig, auf Inosit zu fahnden, einen merkwürdigen, ringförmig gebundenen Zucker von stark süßem Geschmack. Da bisher keine Methoden zur quantitativen Bestimmung dieses Zuckers bekannt sind, mußte ich mich mit dem qualitativen Nachweis desselben begnügen. Dieser Nachweis ist ziemlich schwierig, und er gelingt nur, wenn die Lösung, in der Inosit nachgewiesen werden soll, ziemlich frei von Verunreinigungen ist. Ich bediente mich des Verfahrens von Meillère und Fleury¹⁾ und versetzte 10 ccm schwach angesäuerte Stammlösung D solange mit Bleiacetat, als noch ein Niederschlag ausfiel. Das Filtrat wurde neutralisiert und der Reihe nach mit Bleiessig, Cadmiumnitrat und Ammoniak versetzt, bis keine weitere Fällung mehr eintrat. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, in wässriger Lösung suspendiert mit Schwefelwasserstoff behandelt und hierauf von den ausgefällten Sulfiden abfiltriert. Die so erhaltene Lösung wurde auf dem Wasserbade konzentriert und für die Reaktion auf Inosit verwendet.

Die Lösung reduzierte Tollens'sche Silberlösung (3 g Silbernitrat in 30 ccm Ammoniak [Spez. Gew. 0,923] gelöst und mit 30 ccm 10%iger Natronlauge gemischt) in der Wärme kräftig.

Die sehr alte Reaktion von Scherer und Seidel²⁾, die auch mit reinem Inosit nicht gut gerät, trat nur sehr undeutlich ein.

¹⁾ Journ. Pharm. Chim. 1910, [7], 1, 378.

²⁾ Annalen der Chemie 1852, 81, 375.

Die Reaktion von Gallois¹⁾ beruht darauf, daß beim Versetzen einer Inositolösung mit Mercurinitrat ein gelblicher Niederschlag auftritt, der beim Erwärmen über weißgelb dunkelrot werden soll, beim Erkalten wieder verblaßt und beim erneuten Erwärmen wieder rot wird. Ich führte die Reaktion mit Millon'schem Reagens aus, das ja lediglich aus einer Mercurinitratlösung besteht.

Eine reine Inositolösung (Kahlbaum'sches Präparat) ergab einen hellgelben Niederschlag, der beim Erhitzen zuerst verblaßte, dann tiefgelb wurde. Ein roter Farbenton war nicht zu bemerken, trotz langem Erhitzen. Beim Erkalten wurde die Farbe des Niederschlags wieder merklich heller. Die obige, aus Stammlösung D hergestellte Lösung zeigte ein ähnliches Verhalten, nur infolge der jedenfalls geringeren Konzentration etwas schwächer und daher undeutlicher.

Die angeführten Reaktionen sind nicht besonders schön, und das Vorhandensein von Inosit kann nicht als scharf bewiesen gelten. Immerhin ist die Anwesenheit dieses Zuckers sehr wahrscheinlich gemacht.

9. Tabellarische Zusammenstellung und Auswertung der gefundenen Analysenzahlen.

Die Tabellen 16—18 (S. 337—339) geben eine Übersicht über die im analytischen Teile in verschiedenen Tabellen niedergelegten Zahlen.

Tabelle 17 zeigt einmal die Mengenverhältnisse der organischen Extraktivstoffe in Prozenten der Trockensubstanz und ist in dieser Beziehung nur ein Auszug aus Tabelle 16. Andererseits werden die einzeln bestimmten organischen Stoffe in Prozenten der überhaupt anwesenden organischen Stoffe angegeben. Die Gesamtmenge der organischen Stoffe (unterste Zeile der Tabelle) wurde durch Subtraktion der direkt bestimmten Reinascheprozente von 100 ermittelt. Die zweitunterste Zeile gibt den Fehlbetrag (Differenz zwischen der Gesamtmenge und der Summe der einzeln bestimmten organischen Stoffe), d. h. die Menge der organischen Stoffe, die noch zu bestimmen wären, für die aber, wie z. B. beim ersten Dialysat, die Bestimmungsmethoden fehlen. Bei einzelnen Fraktionen (A, C, E) erreicht der Fehlbetrag Werte von 36—60%; diese Fraktionen wurden vorläufig nicht genauer untersucht, weil sie entweder in zu kleinen Mengen vorhanden waren, oder für die Untersuchung auf Geschmacksstoffe kein Interesse boten.

Der Fehlbetrag bei den eingehend untersuchten Fraktionen B und D beträgt immer noch gegen 12%; es dürfte indessen sehr schwer halten, die organischen Stoffe, die in diesen 12% noch enthalten sind, direkt zu bestimmen. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hier um Körper wie Fleischsäure, Inosinsäure, Inosin, Carnin und ähnliche, für die quantitative Bestimmungsmethoden bisher nicht bekannt sind.

Immerhin ergibt sich aus dieser Tabelle, daß vor allem das erste Dialysat, das die hauptsächlichsten Geschmacksträger enthält, relativ einfach zusammengesetzt ist, und daß es, wenn auch die quantitative Analyse der organischen Bestandteile vorliegt, nicht schwer sein sollte, festzustellen, welche der im ersten Dialysat enthaltenen Körper den Fleischbrühegeschmack hervorbringen. Für die Mengenverhältnisse, die bei einer solchen Synthese des Fleischbrühegeschmacks anzuwenden wären, liegen hier genaue Anhaltspunkte vor.

¹⁾ Zeitschr. analyt. Chem. 1865, 4, 264.

Tabelle 16.
Übersicht über die Zusammensetzung der festen Fleischbrühe und ihrer Fraktionen.
(In Prozenten der Trockensubstanz.)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Versuchs- Nr.	Ta- belle Nr.	Spalte Nr.	Bestandteile	Erstes Dialysat D	Krystall- fraktion D ₁	Rück- stände D ₂	Nichtdia- lysiertes E	Alkohol- un- lösliches C	Alkohol- lösliches B	Krystall- fraktion B ₁	Festes- Fleischbrü- pulver A
1605	1	3	Reinsache	47,292	90,240	47,292	5,645	24,983	20,806	51,320	23,760
1605	1	3	Organische Stoffe	52,708	9,760	52,708	94,355	75,017	79,194	48,680	76,240
1605	1	5	Chlor	2,248	0	2,248	0	0,502	0,263	23,906	1,203
1605	1	7	Kaliumchlorid	4,728	0	4,728	0	1,094	0,553	50,262	2,530
1610	6	4	Gesamt-Phosphor	10,026	?	10,026	2,876	5,681	0	0	3,870
1611	7	4	Phosphor, anorgan. gebunden	8,749	?	8,749	1,951	4,215	0	0	2,940
1611	8	5	" organ. gebunden	1,277	0	1,277	9,925	1,464	0	0	0,930
1621	—	—	Gesamt-Schwefel	0,516	0	0,516	—	—	—	—	—
1620	—	—	Schwefel, anorgan. gebunden	—	—	—	—	—	—	—	—
1620, 1621	—	—	als Schwefelsäure	0,902	0	0,902	—	—	—	—	—
1606	2	4	Schwefel, organ. gebunden .	0,221	0	0,221	—	—	—	—	—
1607	5	5	Gesamt-Stickstoff	10,480	3,920	9,007	15,014	12,006	9,384	17,322	12,063
1615	10	4	Ammoniak	2,299	0	2,299	0,766	0	1,047	0	1,443
1615	10	4	Kreatinin	1,432	—	1,432	1,909	0,407	0,896	—	3,021
1615	10	5	Gesamt-Kreatinin	3,906	10,547	3,906	4,448	3,782	1,815	46,603	5,107
1615	10	6	Kreatin	2,869	—	2,869	2,946	3,915	1,006	—	2,420
695, 696 } 1614 }	12	4	Hypoxanthin	0,750	0	0,750	1,323	0,894*)	3,282*)	0	1,574
1601	—	—	Carnosin als Nitrat	11,180	0	11,180	—	—	—	—	—
1601	—	—	Methylguanidin als Sulfat .	1,214	0	1,214	—	—	—	—	—
1612, 1616	9	—	Glutaminsäure, frei	3,665	0	3,665	0	1,124	0,609	0	0,960*)
1608	4	3	Ameisensäure, frei	0,739	0	0,739	0,194	0,093	0,089	0	0,178
1608	4	5	Essigsäure, frei	12,591	0	12,591	3,081	3,072	4,449	0	2,458
1608	4	8	Milchsäure, frei	6,806	0	6,806	14,295	18,774	51,898	0	27,148

*) Geschätzt.

Ta-

Übersicht über die in der festen Fleischbrühe und
In Prozenten der Trockensubstanz (Tr.-S.) und

1	2	3	4	5
Bestandteile	Erstes Dialysat		Krystallfraktion	
	D		D ₁	
	Tr.-S.	Org. St.	Tr.-S.	Org. St.
Organisch gebundener Phosphor als solcher	1,227	2,42	0	0
Taurin oder Cystin (aus organischem Schwefel) . . .	0,838	1,59	0	0
Ammoniak	2,299	4,36	0	0
Kreatinin	1,432	2,72	—	—
Gesamt-Kreatinin	—	—	10,547	108,06
Kreatin	2,869	5,44	—	—
Hypoxanthin	0,750	1,42	0	0
Carnosin, frei	8,742	16,59	0	0
Methylguanidin, frei	0,704	1,34	0	0
Glutaminsäure, frei	3,665	6,95	0	0
Rest-Stickstoff (s. die Tabelle 18)	3,807	7,22	0	0
Ameisensäure, frei	0,739	1,40	0	0
Essigsäure, frei	12,591	23,89	0	0
Milchsäure, frei	6,806	12,91	0	0
Summe der einzeln bestimmten organischen Stoffe . .	46,519	88,25	10,547	108,06
Fehlbetrag	6,189	11,75	0	+8,06
Organische Stoffe, direkt bestimmt	52,708	100,00	9,760	100,00

Ta-

Übersicht über die
In Prozenten der Trockensubstanz (Tr.-S.)

1	2	3	4	5	6	7
Bestandteile	Erstes Dialysat		Krystallfraktion		Rückstände	
	D		D ₁		D ₂	
	Tr.-S.	Ges.-N.	Tr.-S.	Ges.-N.	Tr.-S.	Ges.-N.
Ammoniak	1,892	18,05	0	0	1,892	21,01
Kreatinin	0,532	5,08	—	—	0,532	5,92
Gesamt-Kreatinin	—	—	3,920	100,00	—	—
Kreatin	0,920	8,78	—	—	0,920	10,21
Purin	0,309	2,95	0	0	0,309	3,43
Carnosin	2,170	20,67	0	0	2,170	24,09
Methylguanidin	0,405	3,86	0	0	0,405	4,50
Glutaminsäure	0,349	3,33	0	0	0,349	3,88
Taurin oder Cystin (Mittel)	0,096	0,92	0	0	0,096	1,07
Summe	6,673	63,64	3,920	100,00	6,673	74,11
Fehlbetrag (Rest-Stickstoff)	3,807	36,36	0	0	2,334	25,89
Gesamt-Stickstoff (direkt bestimmt) .	10,480	100,00	3,920	100,00	9,007	100,00

*) Nicht direkt bestimmte, sondern geschätzte Werte.

belle 17.

ihren Fraktionen vorkommenden organischen Stoffe.
der Gesamtmenge der organischen Stoffe (Org. St.).

6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nichtdialysiertes E		Alkohol- unlöslicher Teil C		Alkohol- löslicher Teil B		Krystallfraktion B ₁		Festes Fleisch- brühepulver A	
Tr.-S.	Org. St.	Tr.-S.	Org. St.	Tr.-S.	Org. St.	Tr.-S.	Org. St.	Tr.-S.	Org. St.
0,925	0,98	1,464	1,95	0	0	0	0	0,930	1,22
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,766	0,81	0	0	1,047	1,32	0	0	1,443	1,89
1,909	2,02	0,407	0,54	0,896	1,13	—	—	3,021	3,96
—	—	—	—	—	—	46,603	91,43	—	—
2,946	3,12	3,915	5,22	1,066	1,35	—	—	2,420	3,17
1,323	1,40	0,894*)	1,19*)	3,282*)	4,14*)	0	0	1,574	2,07
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	0	1,124	1,50	0,609	0,77	0	0	0,960*)	1,26*)
12,194	12,92	10,119	13,49	6,440	8,13	0	0	8,238	10,81
0,194	0,20	0,093	0,12	0,089	0,11	0	0	0,178	0,23
3,081	3,27	3,072	4,10	4,449	5,62	0	0	2,458	3,22
14,295	15,15	18,774	25,02	51,898	65,53	0	0	27,148	35,61
37,633	39,87	39,862	53,13	69,776	88,10	46,603	91,43	48,370	63,44
56,722	60,13	35,155	46,87	9,418	11,90	2,077	8,57	27,870	36,56
94,355	100,00	75,017	100,00	79,194	100,00	48,680	100,00	76,240	100,00

belle 18.

Verteilung des Stickstoffs.
und des Gesamt-Stickstoffs (Ges.-N.).

8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Nichtdialysiertes E		Alkohol- unlöslicher Teil C		Alkohol- löslicher Teil B		Krystallfraktion B ₁		Festes Fleisch- brühepulver A	
Tr.-S.	Ges.-N.	Tr.-S.	Ges.-N.	Tr.-S.	Ges.-N.	Tr.-S.	Ges.-N.	Tr.-S.	Ges.-N.
0,623	4,15	0	0	0,861	9,18	0	0	1,187	9,84
0,709	4,72	0,151	1,26	0,333	3,35	—	—	1,123	9,31
—	—	—	—	—	—	17,322	100,00	—	—
0,944	6,29	1,261	10,46	0,342	3,64	—	—	0,776	6,43
0,544	3,62	0,368*)	3,06*)	1,350*)	14,39*)	0	0	0,648	5,31
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	0	0,107	0,89	0,058	0,62	0	0	0,091*)	0,76*)
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,820	18,78	1,887	15,67	2,944	31,38	17,322	100,00	3,825	31,65
12,194	81,22	10,119	84,33	6,440	68,62	0	0	8,238	68,35
15,014	100,00	12,006	100,00	9,384	100,00	17,322	100,00	12,063	100,00

Zu erwähnen ist noch, daß die Zeile „Rest-Stickstoff“ der folgenden Tabelle entnommen wurde, und die Menge des in seiner Zugehörigkeit noch nicht erkannten Stickstoffs angibt.

Die Tabelle 18 gibt ein Bild über die Verteilung des Stickstoffs auf die einzelnen Fraktionen und Verbindungsgruppen. Es fehlt leider noch manches zur Vervollständigung, namentlich sind hier die Fraktionen A, B, C und E nur lückenhaft untersucht. Dies ist auf ähnliche Gründe zurückzuführen, wie sie bei Besprechung der Tabelle 17 namhaft gemacht wurden, und außerdem handelt es sich bei den stickstoffhaltigen Körpern meistens um Substanzen, die nur sehr schwer rein zu erhalten und als solche zu bestimmen sind.

Überblickt man die Zusammenstellung, die eingangs dieser Arbeit von den in Fleischextrakten gefundenen Substanzen gegeben wurde, so findet man, daß nach Löslichkeitsverhältnissen, Größe des Molekulargewichtes usw. in den einzelnen Fraktionen noch die folgenden Körper vorkommen können:

Im ersten Dialysat:	Molekular- gewicht	Stickstoff- gehalt
Fleischsäure ($C_{10}H_{15}O_5N_3$)	257,15	16,34 %
Inosinsäure ($C_{10}H_{13}O_8N_4P$)	348,14	16,19 „
Inosin ($C_9H_{12}O_5N_4$)	268,14	20,90 „
Carnin ($C_7H_8O_3N_4$)	196,10	28,58 „

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß für diese Körper direkte Bestimmungsmethoden fehlen, und es sei noch erwähnt, daß relativ geringe Mengen dieser stark stickstoffhaltigen Verbindungen genügen, um einen großen Stickstoff-Fehlbetrag zu decken. Ein gewisser Teil des Gesamt-Stickstoffs wird ferner auf die, erst mit den anorganischen Körpern quantitativ zu bestimmenden Nitrate entfallen.

Im nicht dialysierenden Teil bedürfen rund 81 % des Gesamt-Stickstoffs noch der Aufklärung. Der größte Teil dieser Stickstoffmenge entfällt zweifellos auf die in dieser Fraktion angehäuften Eiweißkörper, Albumosen und Peptone. Gewöhnlich berechnet man die Menge der Proteinstoffe durch Multiplikation des gefundenen Stickstoffwertes mit dem Faktor 6,25. Hier ist dies nicht angängig, da außer diesen Körpern auch noch niedriger molekulare Verbindungen vorhanden sind. Da diese Fraktion aber keine Geschmacksträger enthält, so ist diese Lücke nicht von Belang.

Im alkoholunlöslichen Teil dürfte die Menge des aus Proteinstoffen herrührenden Stickstoffes ebenfalls beträchtlich sein; dazu kommen dann noch die übrigen, stark stickstoffhaltigen Verbindungen, die auch im ersten Dialysat sich vorfinden.

Im alkohollöslichen Teil sind etwa 68 % des Gesamt-Stickstoffs noch nicht aufgeklärt. Hier sind sicher keine Eiweißkörper vorhanden; auch Aminosäuren, abgesehen etwa von Prolin, kommen nicht vor, was aus dem unsicheren Ausfall der Ninhydrinreaktion und aus der Unlöslichkeit dieser Stoffe in Alkohol zu schließen ist. Auch andere stickstoffhaltige Körper wie Taurin oder Fleischsäure sind in Alkohol sehr schwer oder gar nicht löslich und kommen nicht in Frage. Andere, wie Cholin, Methylhydantoin usw. sind dagegen sehr leicht löslich und müßten sich relativ leicht nachweisen lassen. Von den meisten stickstoffhaltigen Körpern, wie den Fleischbasen, der Oxyfleischsäure, der Inosinsäure, dem Inosin und Carnin ist die Löslichkeit in absolutem Alkohol unbekannt, und es ist deshalb auch nicht leicht, Anhaltspunkte

über ihr Vorkommen in dieser Fraktion zu geben. Im allgemeinen spielen aber in dieser Fraktion die stickstofffreien Verbindungen, namentlich die Milchsäure, die über 65 % der organischen Stoffe ausmacht, die Hauptrolle und die stickstoffhaltigen sind gegenüber diesen Substanzen eher zu vernachlässigen.

Für das feste Fleischbrühepulver gilt ähnliches wie für die in Alkohol unlösliche Fraktion C.

16. Wirkungen der Alkoholextraktion und der Dialyse auf die verschiedenen Substanzen und ihre Verteilung auf die einzelnen Fraktionen.

Tabelle 19.

Verteilung der Fleischbrühebestandteile auf die einzelnen Fraktionen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Von 100 Teilen der im festen Fleischbrühe- pulver (A) enthaltenen Stoffe	gehen in die einzelnen Fraktionen (in Prozenten):									
	Alkohol- löslicher Teil	Krystall- fraktion	Gesamt- Alkohol- löslicher Teil	Alkohol- unlöslicher Teil	Erstes Dialysat	Krystall- fraktion	Rück- stände	Gesamtes erstes Dialysat	Nicht Dialy- siertes	
	B	B ₁	B+B ₁	C	D	D ₁	D ₂	D+D ₁ +D ₂	E	
Reinasche	23,72	7,40	31,12	68,88	41,08	9,46	2,63	53,17	7,99	
Organische Stoffe	30,04	1,45	31,49	68,51	15,20	0,34	0,97	16,51	43,11	
Chlor	6,59	61,81	68,40	31,60	42,97	0	2,78	45,75	0	
Gesamt Phosphor	0	0	0	100,00	55,86	?	3,56	59,42	25,38	
Phosphor,										
anorgan. geb. .	0	0	0	100,00	65,54	?	4,18	69,72	23,20	
organ. geb. .	0	0	0	100,00	27,44	0	1,76	29,20	31,64	
Gesamt-Stickstoff	23,37	4,45	27,82	72,18	19,89	0,90	1,09	21,88	45,25	
Gesamt-Kreatinin	11,70	29,54	41,24	58,76	19,16	0,24	1,25	20,65	34,66	
Hypoxanthin . .	59,47	0	59,47	40,53	10,48	0	0,64	11,12	29,42	
Glutaminsäure .	18,33	0	18,33	81,67	84,06	0	5,41	89,47	0	

Tabelle 20.

Verteilung der Bestandteile des alkoholunlöslichen Fleischbrühepulvers im ersten Dialysat und im Nichtdialysierten.

	1	2	3	4	5	6
Von 100 Teilen der im alkohol- unlöslichen Fleischbrühepulver (C) enthaltenen Stoffe	gehen in die einzelnen Fraktionen (in Prozenten):					
	Erstes Dialysat	Krystall- fraktion	Rück- stände	Gesamtes erstes Dialysat	Nicht- dialysiertes	
	D	D ₁	D ₂	D+D ₁ +D ₂	E	
Reinasche	67,39	15,52	4,31	87,22	12,78	
Organische Stoffe	25,50	0,57	1,63	27,70	72,30	
Chlor	93,93	0	6,07	100,00	0	
Gesamt-Phosphor	65,81	?	4,20	70,01	29,99	
Phosphor, anorganisch gebunden . .	70,54	?	4,50	75,04	24,96	
„ organisch gebunden	45,10	0	2,89	47,99	52,01	
Gesamt-Stickstoff	29,62	1,34	1,63	31,59	67,41	
Gesamt-Kreatinin	31,26	10,18	2,00	43,44	56,56	
Hypoxanthin	25,86	0	1,57	27,43	72,57	
Glutaminsäure	93,95	0	6,05	100,00	0	

Diese beiden Tabellen 19 und 20 zeigen die Einwirkung der Extraktion mit absolutem Alkohol und der Dialyse auf einzelne Bestandteile des festen Fleischbrühpulvers. Ein Beispiel soll die Art der Entstehung dieser Tabellen zeigen:

In 100 Teilen fester Fleischbrühe finden sich nach Tabelle 1 bzw. 14 27,760 % Reinasche. Extrahiert man das feste Fleischbrühepulver mit Alkohol, so gehen insgesamt 31,926 % in Lösung und 69,760 % bleiben ungelöst. Aus der Lösung scheiden 2,980 % der angewandten Menge als Krystalle B₁ wieder aus, die übrigen 28,946 g werden als alkohollöslicher Teil B bezeichnet. Der alkohollösliche Teil enthält 20,806 %, die Krystallfraktion B₁ 51,320 % und der alkoholunlösliche Teil 24,983 % Reinasche.

28,946 g alkohollöslicher Teil B enthalten also	6,013 g Reinasche
2,980 g Krystallfraktion B ₁	1,529 " "
69,760 g alkoholunlöslicher Teil	17,464 " "

Summe 25,006 g "

Der Bequemlichkeit halber, und damit man auf 100 stimmende Zahlen erhält, werden nun die in den einzelnen Fraktionen gewonnenen Werte von Reinasche in Prozenten dieser Summe statt in Prozenten der wirklich in der ursprünglichen Fleischbrühe bestimmten Menge (23,7607) berechnet und diese Zahlen in die Tabelle eingesetzt:

Von 25,006 g in der festen Fleischbrühe enthaltener Reinasche gehen 6,013 g oder 23,72 % in den alkohollöslichen Teil über, ferner 1,529 g oder 7,40 % in die Krystallfraktion B₁, und 17,464 g oder 68,88 % in den alkoholunlöslichen Teil C.

Auf ähnliche Weise wurde die Tabelle 20 gewonnen, die den Einfluß der Dialyse auf die verschiedenen Substanzen des alkoholunlöslichen Teils zeigt.

Die einzelnen Zahlen der beiden Tabellen zu verfolgen, bietet mannigfaches Interesse:

Die Reinasche ist zum größeren Teil (69 %) alkoholunlöslich und dialysiert sehr leicht, sodaß sich ihre Hauptmenge im ersten Dialysat vorfindet. Auch die organischen Stoffe sind zum größeren Teil alkoholunlöslich, dialysieren aber weniger leicht und reichern sich daher in der letzten Fraktion, dem Nichtdialysierten an.

Die Chloride gehen zum größern Teil in die alkohollösliche Fraktion über; was von dieser Körpergruppe nicht vom Alkohol aufgelöst wurde, findet sich nachher vollständig im ersten Dialysat.

Die Phosphorverbindungen sind völlig unlöslich in Alkohol und gehen daher in den Rückstand der Alkoholextraktion über. Bei der Dialyse verhalten sich aber die anorganischen und organischen Phosphorverbindungen verschieden. Die ersteren dialysieren leicht, die letzteren schwerer und daher finden sich im ersten Dialysat hauptsächlich die anorganischen Phosphate, während sich die organischen Phosphorverbindungen zu ungefähr gleichen Teilen auf das erste Dialysat und das Nichtdialysierte verteilen.

Der Stickstoff der ursprünglichen Fleischbrühe geht zu 23 % in die alkoholische Lösung über, zu 77 % bleibt er ungelöst. Auch die Dialyse hat sehr wenig Einfluß, der größte Teil der stickstoffhaltigen Verbindungen findet sich im Nichtdialysierten.

Von einzelnen stickstoffhaltigen Verbindungen sind das Gesamt-Kreatinin (Kreatin, als Kreatinin berechnet + Kreatinin), die Purine als Hypoxanthin berechnet und die Glutaminsäure aufgeführt. Etwas über 40 % des Kreatinins gehen in die alkoholische Lösung über, vom Rest gehen 43 % in das erste Dialysat und 57 % bleiben im Nichtdialysierten zurück.

Die Purine gehen anscheinend zum größern Teil in die alkoholische Lösung über, doch ist zu bemerken, daß es sich hier um Zahlen handelt, die durch Schätzung und nicht durch direkte Bestimmung gewonnen wurden. Der Einfluß der Dialyse

ist dagegen durch direkt gewonnene Werte belegt; es zeigt sich, daß die im alkoholunlöslichen Teil vorhandenen Purine schlecht dialysieren und sich zu fast $\frac{3}{4}$ ihrer Menge im nicht dialysierten Teil finden.

Von der Glutaminsäure geht nur ein sehr kleiner Teil in die alkoholische Lösung, die Hauptmenge gelangt in den alkoholunlöslichen Teil und von da in das erste Dialysat.

11. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Aus Fleischbrühe, die durch Einlegen von fein zerhacktem, von Fett, Sehnen und Bindegewebe befreitem Rindfleisch in siedendes Wasser und 2-stündiges Kochen gewonnen worden war, ließ sich durch Ausfrieren, Konzentrieren und Trocknen im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd ein sehr hygroskopisches, unter gewissen Vorsichtsmaßregeln aber fein pulverisierbares Dauerpräparat gewinnen. Dieses Präparat ließ sich unter Luftabschluß jahrelang aufbewahren und ergab beim Wiederauflösen in Wasser eine gute und geschmacklich einwandfreie Fleischbrühe. Bei älteren Präparaten schien sich der Geschmack ein wenig in der Richtung nach Fleischextrakt zu verschieben. Die Ausbeute an festem Fleischbrühepulver betrug durchschnittlich 3,8 % des angewandten frischen Fleisches.

2. Durch erschöpfende Extraktion mit absolutem Alkohol bei 40° wurde dieses Dauerpräparat in einen alkohollöslichen, stark sauer reagierenden und schmeckenden und sehr hygroskopischen Teil (etwa 31 %) und einen in absolutem Alkohol unlöslichen, neutralen, nicht hygroskopischen und staubfein pulverisierbaren Teil (etwa 69 % der angewandten Menge fester Fleischbrühe) zerlegt.

Es zeigte sich, daß sich die Geschmacksstoffe zur Hauptsache in dem alkoholunlöslichen Teile befanden. Im alkoholischen Extrakt konnte höchstens eine anscheinend zum vollen Fleischbrühegeschmack gehörige, säuerliche Komponente enthalten sein.

3. Aus der alkoholischen Lösung ließ sich beim Eindampfen eine Krystallfraktion isolieren, die zu ungefähr 51 % aus Chloriden, im übrigen aus Kreatin und Kreatinin zusammengesetzt war und geschmacklich keine Bedeutung besaß.

4. Der alkoholische Extrakt bestand zu $\frac{1}{5}$ aus anorganischen und zu $\frac{4}{5}$ aus organischen Stoffen. Diese Fraktion wurde namentlich auf ihren Gehalt an stickstofffreien, organischen Säuren untersucht, und es wurde gefunden, daß sie etwa 52 % Milchsäure, 4,5 % Essigsäure und 0,1 % Ameisensäure enthielt. Der schwach säuerliche Geschmack von frischer Fleischbrühe dürfte sehr wahrscheinlich auf das Vorhandensein freier Milchsäure zurückzuführen sein. Die weitere, nicht vollständige Untersuchung ergab einen Gehalt von etwas über 9 % Gesamt-Stickstoff, 1 % Ammoniak, 1,8 % Gesamt-Kreatinin, 3 % Purinbasen (schätzungsweise), 0,6 % Glutaminsäure, 0,5 % Kaliumchlorid und völlige Abwesenheit von Phosphorverbindungen.

5. Der alkoholunlösliche Teil des festen Fleischbrühepulvers war zu $\frac{1}{4}$ aus Mineralstoffen und zu $\frac{3}{4}$ aus organischen Stoffen zusammengesetzt. Er enthielt den größeren Teil der in der ursprünglichen Fleischbrühe vorkommenden anorganischen Bestandteile (69 %), sämtliche Phosphorverbindungen, 72 % des ursprünglichen Gesamt-Stickstoffs, 82 % der Glutaminsäure und 59 % der Purine. Die quantitative Analyse wurde, da die folgende Fraktion viel wichtiger war, nicht vollständig ausgeführt. Sie ergab einen Gehalt von fast 19 % Milchsäure (sehr wahrscheinlich als Kalium- oder Calciumsalz), 3 % Essigsäure, 0,1 % Ameisensäure, 1,1 % Glutaminsäure, 3,8 % Gesamt-

Kreatinin, 12 % Gesamt-Stickstoff (hauptsächlich von Eiweißstoffen herrührend), 5,7 % Gesamt-Phosphor und 0,5 % Chlor.

6. Mit Hilfe der Dialyse durch Pergamentmembran gegen reines Wasser ließ sich der alkoholunlösliche Teil des festen Fleischbrühepulvers in eine Reihe von Fraktionen zerlegen. Dabei wurde die unerwartete Beobachtung gemacht, daß nur die zuerst dialysierenden Stoffe Träger des charakteristischen Fleischbrühegeschmackes sind, während die später dialysierenden Körper und der nicht dialysierende Teil (Eiweißkörper, Albumosen, Peptone usw.) fast oder gar nicht mehr der Fleischbrühe ähnlich schmecken. Im Hauptversuch wurde daher der alkoholunlösliche Teil nur so lange der Dialyse unterworfen, bis angenommen werden konnte, daß die Hauptmenge der Geschmacksstoffe die Pergamentmembran passiert hatten (etwa 37 % der angewandten Substanzmenge), hierauf wurde die Dialyse unterbrochen und der nicht dialysierte Rest als Fraktion für sich untersucht.

7. Das erste Dialysat schied beim Konzentrieren im Vakuum eine kleine Menge von Krystallen aus, die zu 90 % aus Kalium- und Calciumphosphaten und zu 10 % aus Kreatin und Kreatinin bestanden und 3,8 % der der Dialyse unterworfenen Substanzmenge ausmachten.

8. Das erste Dialysat stellte sich nach dem völligen Trocknen im Vakuum als ein staubfein pulverisierbares, luftbeständiges, spielend in Wasser lösliches und schwach gelblich gefärbtes Pulver dar. Es wurde einer möglichst genauen Analyse unterworfen, die hauptsächlich die vorhandenen organischen Stoffe betraf, während die quantitative Analyse der Aschenbestandteile aus bestimmten Gründen noch unterblieb. Es wurden etwas über 88 % der organischen Stoffe identifiziert, für den Rest, der sich wahrscheinlich aus Fleischsäure, Phosphorfleischsäure, Inosinsäure, Inosin, Carnin und ähnlichen Stoffen zusammensetzt, fehlen die Bestimmungsmethoden. Diese wichtigste Fraktion, die durch die vorhergehenden Operationen von Ballaststoffen weitgehend befreit war, zeigte eine relativ einfache Zusammensetzung: sie bestand zu fast gleichen Teilen (47 und 53 %) aus anorganischen und organischen Stoffen.

Von den Aschebestandteilen wurden Chlor und Phosphor bestimmt und gefunden, daß etwa 10 % der Mineralstoffe aus Kaliumchlorid, der Rest zur Hauptsache aus Phosphaten neben wenig Carbonaten und möglicherweise Nitraten und Sulfaten bestand. An Metallen waren sehr viel Kalium, viel Calcium, wenig Natrium und Magnesium vorhanden.

Die organischen Stoffe dieser Fraktion waren etwas reichhaltiger zusammengesetzt. In Prozenten der Gesamtmenge der organischen Stoffe wurden gefunden: Taurin oder Cystin (Mittelwert) 1,6 %, Ammoniak 4,4 %, Kreatinin 2,7 %, Kreatin 5,4 %, Hypoxanthin 1,4 %, Carnosin 16,6 %, Methylguanidin 1,3 %, Glutaminsäure 7 %, Ameisensäure 1,4 %, Essigsäure 23,9 %, Milchsäure 12,9 %, organisch gebundener Phosphor als solcher 2,4 % und in seiner Zugehörigkeit nicht aufgeklärter Stickstoff 7,2 %. Sowohl die sauren, wie die basischen Bestandteile sind in freiem Zustande angenommen und berechnet.

Es zeigte sich, daß die Hauptmenge der Reinasche (87 %), die im alkoholunlöslichen Teile enthalten war, sich hier wieder vorfand; ferner alles Chlor, 75 % des anorganisch gebundenen Phosphors, 48 % des organisch gebundenen Phosphors und die gesamte Glutaminsäure. Die übrigen im alkoholunlöslichen Teile anwesenden Substanzen, vor allem der Großteil der organischen Stoffe, alle Eiweißkörper, die

meisten Stickstoffverbindungen, Gesamt-Kreatinin und Purin waren bei der Dialyse im Pergamentbeutel zurückgeblieben und fanden sich in der nicht dialysierten Fraktion.

Man dürfte also mit der Ansicht kaum fehlgehen, daß die zuletzt erwähnten Stoffe und Stoffgruppen am Fleischbrühegeschmack keinen oder keinen wesentlichen Anteil haben, und daß dieser charakteristische Geschmack einigen wenigen organischen Stoffen, hauptsächlich im Gemisch mit anorganischen Verbindungen seine Entstehung verdankt.

9. Der nicht dialysierte Anteil des alkoholunlöslichen Fleischbrühepulvers, ein neutral reagierendes, in trockenem Zustande nicht hygroskopisches und aus 95 % organischen, 5 % anorganischen Stoffen bestehendes Substanzgemisch, bot infolge seiner fast völligen Geschmacklosigkeit wenig Interesse. In der Hauptsache bestand dieses Pulver aus hochmolekularen, kolloidalen Körpern: Eiweiß, Albumosen, Peptonen usw., doch enthielt es, da die Dialyse vorzeitig abgebrochen worden war, naturgemäß auch noch andere, niedrig molekulare Substanzen, die indessen für die Geschmacksbildung nicht von Bedeutung sind.

Über die Inhaltsstoffe der Rhabarberblätter.

Von

G. Maue, Marine-Stabsapotheker in Kiel.

[Eingegangen am 16. Juli 1920.]

Am 7. Mai 1918 brachten die Kieler Neuesten Nachrichten die Mitteilung, daß in Düsseldorf nach dem Genuß eines wie Spinat zubereiteten Gerichtes von Rhabarberblättern eine neunköpfige Familie an Vergiftungserscheinungen erkrankte. Ein Kind sei gestorben, ein anderes schwebte in Lebensgefahr. Nach ärztlicher Ansicht liege Vergiftung durch den Genuß der Rhabarberblätter vor. — Am gleichen Tage erließ das Hamburgische Kriegsversorgungsamt eine Verfügung, nach der Abfälle von Spargel und Rhabarber in den Haushaltungen nicht der Abfallverwertung zugeführt werden sollten, sondern in die Unrateimer zu werfen seien. Diese Abfälle seien zur Viehfütterung ungeeignet. — Wenige Tage darauf, am 18. Mai 1918, berichtete auch die Kieler Zeitung auf Grund eines Gutachtens des Reichsgesundheitsamtes über die Gefahren beim Genuß von Rhabarberblättern. Zugegeben wurde in diesen Ausführungen, daß die Meinungen über die Schädlichkeit des Genusses dieser Blätter geteilt seien. Jedenfalls seien die Blätter des Rhabarbers beträchtlich reicher an Oxalsäure als deren Stiele und, als Spinat gekocht und gegessen, häufig die Ursache heftiger Durchfälle, von Mattigkeit und auch Nierenentzündung, sodaß vor dem Genuß nicht abgekochter Blätter und des Kochwassers gewarnt werden müsse. Als zweckmäßig wird empfohlen, dem Kochwasser etwas Kalk zuzusetzen, um den löslichen Anteil der Oxalsäure in den Rhabarberblättern in die unlösliche Calcium-Verbindung überzuführen; Sodazusatz (etwa wie bei Linsen) zum Kochwasser sei gänzlich zu vermeiden, da dieser die Löslichkeit der Oxalsäureverbindungen noch erhöhe.

Hierzu sei bemerkt, daß die Oxalsäure im Rhabarber (wie in vielen anderen Pflanzen) in löslicher Form als saures Kaliumoxalat und in unlöslicher Form als Calciumoxalat vorhanden ist; freie Oxalsäure kommt im Pflanzenreich nur ganz selten vor.